

# La Expansión Clonal y el Espectro Mutacional en la Evolución de la Resistencia a Antibióticos

TESIS DOCTORAL

por

Alejandro Couce

Madrid, 2012



*La multiplicidad de la naturaleza me llena de gozo, dejo la quimera de la  
verdad para políticos y predicadores.*

Stephen Jay Gould  
(*'Ever Since Darwin'*, 1977)



A mis padres, y a mi abuelo Norberto.



## Agradecimientos

Gran parte del trabajo que aquí se presenta ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III, por dos cauces diferentes. En primer lugar, mediante la ayuda predoctoral de formación en investigación (nº de expediente FI05/00569) que me fue concedida allá en el 2006; y mediante el proyecto PI10/00105 otorgado al director de esta tesis, el Prof. Jesús Blázquez. A este último quiero agradecer la oportunidad que me dio para poder iniciarme en los caminos de la Ciencia, así como toda la confianza que ha depositado en mí a lo largo de estos años.

Quisiera también mostrar mi gratitud a una serie de 'maestros' de los cuales he tenido la suerte de aprender gran cantidad de lecciones, que abarcan desde las cuestiones más técnicas hasta las más intelectuales, y que han sido clave para mi desarrollo tanto científico como personal. Estos maestros son los Dres. Juan Poyatos, Alexandro Rodríguez, José María Gómez, Javier Ramos y Keilor Rojas.

Mi gratitud también se dirige a los compañeros del laboratorio, presentes y pasados, que han contribuido a crear un ambiente de camaradería sin el cual hubiera sido mucho más difícil afrontar el desánimo recurrente tan característico de esta hermosa profesión. Mención especial merecen Alexandro Rodríguez y Jerónimo Rodríguez; con quienes he disfrutado enormemente, día tras día, discutiendo de la Ciencia y de la Vida. No me puedo olvidar tampoco de 'las niñas', que junto a Alexandro y Jerónimo me han hecho sentir estos últimos años parte de una gran familia.

Fuera del ámbito laboral estoy en deuda con mi familia, mis amigos y mi pareja, Lourdes, que han aceptado generosamente el verse privados de mi atención, demandada a todas horas por esa amante tan celosa que ha resultado ser la Ciencia.





# Indice

<b>1. Introducción general</b>	<b>1</b>
1. La mutación: causas y consecuencias	2
2. El experimento de Luria-Delbrück y la expansión clonal	6
3. Mutadores y espectro mutacional	8
4. Modelos experimentales usados en esta tesis	10
1. El modelo de la resistencia a antibióticos	10
2. Dos bacterias ejemplares: <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	13
3. Experimentos de evolución con microorganismos	16
4. Modelos experimentales <i>in silico</i>	20
<b>2. Objetivos de la investigación</b>	<b>25</b>
<b>3. Estimación de la tasa de mutación con bajo número de réplicas</b>	<b>27</b>
1. Introducción	27
2. Materiales y métodos	29
3. Resultados y Discusión	33
<b>4. La expansión clonal y la diversidad genética de una población asexual</b>	<b>41</b>
1. Introducción	41
2. Materiales y Métodos	43
3. Resultados y Discusión	47
<b>5. El espectro mutacional y la emergencia de estirpes mutadoras</b>	<b>55</b>
1. Introducción	55
2. Materiales y Métodos	56
3. Resultados y Discusión	59
<b>6. El espectro mutacional y la repetibilidad de la evolución molecular</b>	<b>69</b>
1. Introducción	69
2. Materiales y Métodos	71
3. Resultados y Discusión	74
<b>7. Conclusiones</b>	<b>81</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>83</b>
<b>9. Anexo</b>	<b>97</b>
1. Artículos culminados durante la realización de esta tesis	97



# 1 Introducción general

La capacidad de una población microbiana para desarrollar resistencia a antibióticos, o en general experimentar cualquier tipo de evolución adaptativa, viene determinada por su grado de diversidad genética (Fisher 1930). Esta tesis, a grandes trazos, se ocupa de algunas de las consecuencias que el modo de reproducción asexual, característico de los microbios, tiene sobre esta diversidad. En concreto, de las consecuencias derivadas de los fenómenos de expansión clonal y selección indirecta, particularmente intensos en poblaciones asexuales.

El término expansión clonal hace referencia al incremento de la abundancia de un determinado genotipo producido mediante división celular, sin consideración de la acción de la selección natural. Así, en una población que crece exponencialmente, la expansión clonal de los mutantes aparecidos antes de la última generación hace que el número final de mutantes sobrepase al número total de mutaciones (Luria y Delbrück 1943). Este hecho conlleva al menos dos implicaciones importantes. Por un lado, complica enormemente la estimación de la tasa de mutación, parámetro clave en nuestra comprensión de la biología evolutiva de los organismos. Varios métodos estadísticos han sido desarrollados para solventar este problema, aunque su uso con un bajo número de replicas, circunstancia experimental bastante frecuente, requiere todavía de la validación adecuada (Foster 2006). Esta tarea conforma uno de los objetivos de esta tesis. Por otro lado, ya que las mutaciones tempranas están sobrerrepresentadas en el censo final, se incrementa la probabilidad de que dos mutantes cogidos al azar pertenezcan al mismo clon, lo que en la práctica supone una reducción de la diversidad genética respecto a su máximo teórico. Aunque tanto el cálculo como los determinantes de esta probabilidad han recibido mucha atención por su importancia en áreas como la biología de la conservación, la genética cuantitativa o la epidemiología molecular (Weir y cols. 2006), el efecto de la expansión clonal sobre la misma permanece poco estudiado, y constituye precisamente otro de los objetivos de esta tesis.

Respecto a la selección indirecta el caso que aquí nos ha interesado es el de los alelos mutadores, que proliferan en poblaciones microbianas asociados a mutaciones beneficiosas con las que comparten genoma (Taddei y cols. 1997). Este fenómeno, muy estudiado debido a su relevancia clínica, ha sido entendido exclusivamente en términos del incremento que estos alelos provocan en la tasa de mutación, en ocasiones de hasta tres órdenes de magnitud (Tenaillon y cols. 1999). Sin embargo, este incremento está generalmente limitado a un espectro muy concreto de tipos mutacionales, característico

de cada alelo mutador (Miller 1996). Recientemente se ha sugerido que el espectro mutacional, al sesgar la asociación entre alelos mutadores y mutaciones beneficiosas, podría tener algún impacto sobre la evolución de estirpes hipermutadoras (MacLean y cols. 2010). La exploración de esta hipótesis abarca el resto de objetivos esta tesis.

Metodológicamente, los problemas aquí investigados han sido abordados mediante una combinación de métodos computacionales (simulaciones por ordenador) y experimentos con bacterias. En estos últimos, la resistencia a antibióticos se ha utilizado profusamente tanto por su valor como herramienta experimental como por su interés en sí misma. Un reciente estudio del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades estimó que la evolución la resistencia múltiple a antibióticos supone anualmente en la UE la muerte de unos 25000 pacientes y unas pérdidas económicas en torno a los 1.5 millones de euros (ECDC/EMA 2009). Es nuestra convicción que los resultados expuestos en esta tesis contribuirán a expandir nuestro conocimiento sobre la genética evolutiva de estos fenómenos de tan perentoria y funesta actualidad.

En este capítulo introductorio trataremos de enmarcar los trabajos de investigación aquí presentados en un contexto científico más amplio. En lo que sigue, ofreceremos una descripción somera de los conceptos básicos, antecedentes y modelos experimentales necesarios para dotar de significado a los objetivos que han regido esta tesis doctoral.

## **1.1 La mutación: causas y consecuencias**

A pesar del papel que hoy día adscribimos a la mutación como fuente última de toda diversidad genética, prerequisite para el proceso evolutivo, ésta se hallaba completamente ausente en la formulación original de la teoría de Darwin. Habida cuenta del completo desconocimiento que se tenía en 1859 acerca de los mecanismos de la herencia, tal ausencia es perfectamente comprensible. Darwin y sus contemporáneos imaginaban la variación heredable como infinitesimalmente continua, generada mediante minúsculas fluctuaciones en respuesta a los cambios del ambiente (Stoltzfus 2006). El concepto de herencia mediada por partículas discretas no fue generalmente aceptado hasta cuatro décadas más tarde, cuando una serie de científicos redescubrieron, de forma casi simultánea, las leyes de Mendel. Uno de ellos, el genetista holandés Hugo de Vries, había observado, además, que nuevos rasgos podían aparecer de forma súbita en el lapso de una generación. Interpretando estas observaciones dentro de un modelo de herencia particulada, de Vries acuñó el término

'mutación' para referirse al cambio espontáneo en las propiedades de las partículas heredables (Gayon 1998).

Una década después de su introducción como concepto, mucho antes de que se dilucidase su naturaleza física, el genetista Reginald Punnett ya se refería a la mutación 'como la base de la evolución, como el material sobre el cual la selección natural trabaja' (Punnett 1915). Esta noción, que fue completamente asimilada por el consenso de la Síntesis Moderna, ha resistido prácticamente un siglo de avances en genética y evolución, y es todavía esencial en la comprensión contemporánea del proceso evolutivo (Futuyma 2009). En la actualidad se acepta que la variación heredable se genera mediante una jerarquía de eventos genéticos, la mutación puntual en la base de todos ellos, resultando condición *sine qua non* para la acción de otros fenómenos como la recombinación, los elementos móviles, los reordenamientos cromosómicos o la transferencia horizontal de genes.

La naturaleza física de las mutaciones no pudo empezar a comprenderse hasta la segunda mitad del s. XX, pues ello requería en primer lugar establecer la naturaleza física del gen. Ello no impidió a Max Delbrück, en 1935, realizar su famosa conjetura de que las mutaciones eran cambios en el estado cuántico de la 'colección de átomos' que conformarían el gen, cambios inducidos bien por la absorción de energía radiante, bien por la reacción química con sustancias tales como el gas mostaza (Fischer 2007). Así, la idea de que las mutaciones eran debidas a la acción de agentes exógenos (emanaciones de las estrellas, las rocas o la industria química) se mantuvo dominante hasta bien entrada la década de los 60, a pesar de que con la publicación del modelo de la doble hélice, en 1953, ya se había sugerido que las mutaciones podrían producirse también fruto de errores ocasionales en la replicación (von Borstel 1994).

Los esfuerzos experimentales de las últimas décadas, sin embargo, han revelado que la contribución de las fuentes exógenas a la tasa de mutación espontánea es en realidad minoritaria, salvo – claro está – en casos de exposición excepcional (Friedberg y cols. 2006). Hoy sabemos que la mayor parte de las mutaciones se producen por causas endógenas, que podemos clasificar en dos grandes categorías: errores nativos en la replicación y alteraciones bioquímicas. Ambos tipos de mutaciones son consecuencia de las propiedades fisicoquímicas de la molécula de ADN; en el primer caso debido a su flexibilidad estructural, y en el segundo debido a la gran reactividad que presenta, especialmente con el agua y el oxígeno, en condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

Dentro de los errores nativos en la replicación, distinguiremos aquí entre mutaciones simples (cambios puntuales de base e *indels* de uno o dos nucleótidos) y complejas (cambios múltiples de base e *indels* de múltiples nucleótidos). Los cambios

puntuales de base se deben al hecho de que los cuatro nucleótidos pueden aparearse de forma no canónica entre sí, a expensas de introducir una pequeña distorsión en la molécula de ADN (Friedberg y cols. 2006). Este tipo de eventos ocurren espontáneamente con una frecuencia en torno  $10^{-4} - 10^{-5}$  por base por replicación, según estimaciones *in vitro* con la subunidad procesiva de la ADN polimerasa III de *E. coli* (Sloane y cols. 1988). La acción de la subunidad correctora, junto con el sistema de reparación post-replicativa de emparejamentos erróneos (MMR), hace que *in vivo* esta frecuencia disminuya prácticamente cinco órdenes de magnitud (Drake y cols. 1998). Pequeñas distorsiones estructurales también son necesarias para los indels de uno o dos nucleótidos, ya que para su formación una de las hebras debe formar un pequeño bucle que provoque, en última instancia, el corrimiento de la posición relativa de una secuencia respecto a la otra (Maki 2002).

Por su parte, las mutaciones complejas pueden producirse por una miríada de diferentes mecanismos, aunque todos comparten el denominador común de involucrar el uso de un molde alternativo: secuencias con cierto grado de homología que residen dentro de la misma horquilla de replicación (Lovett 2004). Dos de los ejemplos mejor caracterizados son las mutaciones provocadas por secuencias cortas repetitivas y por secuencias cuasipalíndromas complementarias, cuyos mecanismos de funcionamiento han sido excelentemente revisados por Lovett (Lovett 2004). Este tipo de secuencias, además, suelen destacarse por presentar una alta mutabilidad, dando lugar a lo que se conoce como 'puntos calientes': en *E. coli*, dos tercios de las mutaciones que inactivan el gen *lacI* recaen sobre una secuencia repetitiva conformada por la triple repetición del motivo CTGG (Schaaper y cols. 1986), mientras que prácticamente la mitad de las que inactivan el gen *thyA* lo hacen sobre una secuencia cuasipalindrómica complementaria de 17 pares de bases (Dutra y Lovett 2006).

A diferencia de los errores nativos en la replicación, cuya existencia fue postulada en cuanto se reveló la estructura de la doble hélice, la posibilidad de que el ADN pudiera estar sometido a alteraciones constantes por parte de los constituyentes del medio intracelular resultaba, parafraseando a Franklin Stahl, 'impensable' (Friedberg 2003). Sin embargo, lo cierto es que la molécula de ADN presenta numerosas dianas susceptibles de reaccionar con el agua, el oxígeno y, en menor medida, con otras moléculas esenciales del metabolismo como el cofactor S-adenosil-metionina (Lindahl 1993).

Una de las lesiones más comunes causadas por el agua es la hidrólisis del enlace N-glicosídico, lo que supone la escisión de la base nitrogenada de su correspondiente desoxiribosa (Lindahl 1993). El hueco resultante, si no es restaurado a tiempo por una serie de enzimas específicas, impedirá el avance de la maquinaria replicativa normal,

con consecuencias letales salvo intervención de las polimerasas del sistema SOS (Friedberg y cols. 2006). Es en estos casos donde la lesión puede finalmente convertirse en mutagénica, ya que estas polimerasas de emergencia, que permiten el desbloqueo de la replicación, exhiben una alta propensión a introducir mutaciones. Los grupos amino de los nucleótidos reaccionan también frecuentemente con el agua, en especial los de la citosina y su variante metilada, la 5-metil-citosina. El efecto mutagénico es aquí directo, ya que los productos de estas desaminaciones son el uracilo y la timina, respectivamente, que se aparearán con una adenina en la siguiente ronda de replicación, dando como resultado una mutación C:G→T:A (Friedberg y cols. 2006).

Si bien estos eventos de hidrólisis contribuyen significativamente a la mutación espontánea, las estimaciones indican que el principal causante de la misma es, en realidad, la oxidación (Maki 2002). El ADN está constantemente expuesto a numerosas especies reactivas del oxígeno – consecuencia inevitable del metabolismo aerobio – entre las cuales destaca el radical hidroxilo por su reactividad con los dobles enlaces presentes en las bases nitrogenadas (Friedberg y cols. 2006). Aunque que se han identificado decenas de especies de bases alteradas como resultado de estas reacciones, la más importante en términos mutagénicos es la 8-oxo-guanina, capaz de aparearse tanto con la citosina como con la adenina (Maki 2002). Como resultado de esta ambigüedad, la 8-oxo-guanina produce dos tipos de mutaciones: transversiones G:C→T:A si la oxidación se produce en una guanina ya incorporada al ADN, y transversiones A:T→C:G si ésta se produce sobre la forma libre del nucleótido, antes de incorporarse a una nueva cadena de ADN (Miller 1996). Ambos tipos de mutaciones son prevenidas en *E. coli* y otras bacterias mediante la acción de las diferentes enzimas del sistema GO (Michaels y Miller 1992), que serán objeto de una descripción más detallada en el apartado 1.4.

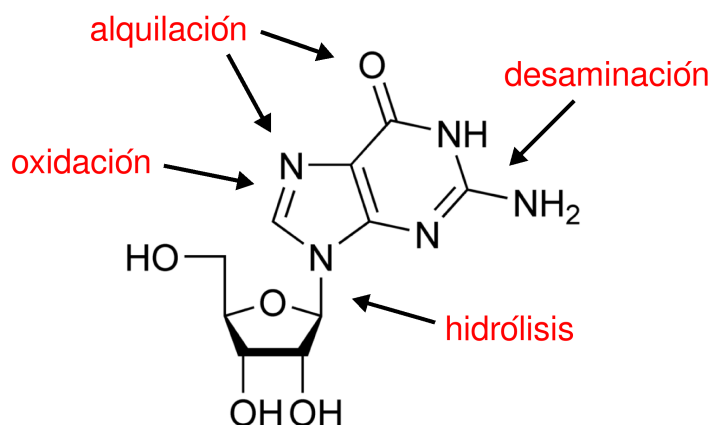


Figura 1.1- Principales grupos funcionales susceptibles de reaccionar espontáneamente en un nucleósido de guanina.

## **1. 2 La expansión clonal y el experimento de Luria-Delbrück**

Las bacterias fueron las grandes excluidas de la Síntesis Moderna. A principios de la década de los 40, en uno de los libros emblemáticos del nuevo paradigma, James Huxley justificaba esa exclusión alegando que las bacterias no poseían 'genes en el sentido de porciones discretas de substancia hereditaria', y que por tanto era esperable que 'los procesos de variación, herencia y evolución' fueran diferentes a los de 'organismos multicelulares' (Huxley 1975). Las razones por las cuales estas creencias habían prevalecido hasta entonces se encuentran en el hecho de que las bacterias, a diferencia plantas o moscas, se reproducían asexualmente, parecían no tener cromosomas y, sobre todo, no presentaban caracteres fenotípicos que permitieran observar claramente herencia particulada. Como consecuencia, muchos autores consideraban que la evolución en bacterias operaba según un modelo lamarckista, donde la variación heredable era inducida por la propia presión de selección .

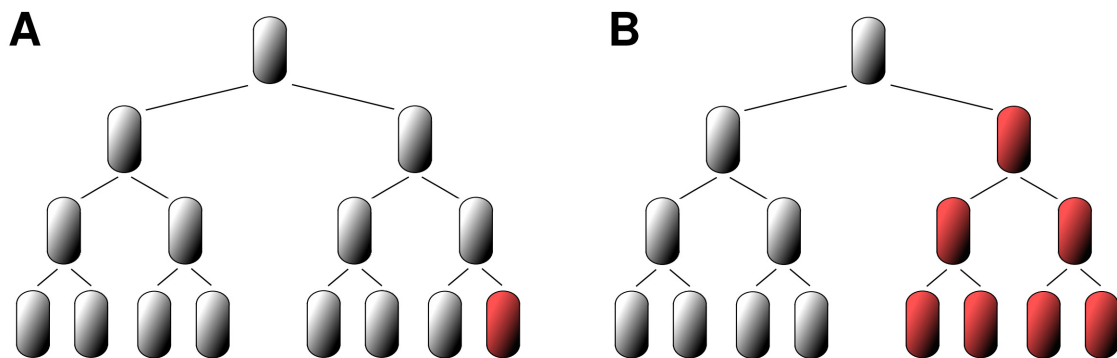
Uno de los casos más debatidos era el de la aparición de variantes bacterianas resistentes a la acción de virus bacteriófagos. Ya que la única forma de observar estos mutantes era mediante la exposición de las bacterias al virus, resultaba imposible saber si las mutaciones eran causadas por el propio contacto con el virus o si, por el contrario, habían sucedido espontáneamente antes de dicha exposición. Tratando de sortear este problema, Salvador Luria y Max Delbrück se propusieron estimar la proporción de resistentes en diferentes estadios del crecimiento de un cultivo, bajo el razonamiento de que si la mutación era espontánea esta proporción debería incrementarse con el tiempo. Sin embargo, y para su sorpresa, se encontraron con que este número presentaba un grado enorme de variabilidad. No tardaron en darse cuenta de que 'esas fluctuaciones no eran debidas a alguna condición no controlada' de los experimentos, sino que eran precisamente una 'consecuencia necesaria' del modelo de mutación espontánea, hipótesis que podría demostrarse mediante el estudio cuantitativo de dichas fluctuaciones (Luria y Delbrück 1943). El resultado fue uno de los experimentos más influyentes de la historia de la Biología, el test de fluctuación de Luria y Delbrück.

En su autobiografía, Salvador Luria relata cómo la observación una máquina tragaperras le sugirió que esa variabilidad en el número de resistentes, lejos de ser un problema, podría ofrecer una solución (Luria 1984). Si los mutantes se producían de forma espontánea, éstos podrían aparecer en cualquiera de las generaciones anteriores a la exposición al virus. A generaciones más tempranas, menor probabilidad de



ocurrencia de una mutación; pero también mayor el número final de mutantes al que, por expansión clonal, ésta daría lugar. En el extremo, de forma muy infrecuente, una mutación muy temprana se traduciría en un número enorme de mutantes, lo que sería asimilable al premio gordo de una máquina tragaperras. Como consecuencia el número de mutantes por cultivo debería seguir una 'distribución con una varianza anormalmente alta' (Luria y Delbrück 1943). En contraposición, si la mutación era inducida por el virus, no habría expansión clonal y por tanto el número de mutantes por cultivo seguiría una distribución de Poisson; que es la apropiada para describir procesos poco probables como la supervivencia de una bacteria al ataque de un virus, y cuya varianza se aproxima característicamente al valor de la media.

Luria y Delbrück mostraron cómo en una serie idéntica de cultivos paralelos la varianza en el número de mutantes por cultivo podía ser hasta dos órdenes de magnitud mayor que la media, rechazando por tanto que este número se distribuyera de forma poissoniana y, en última instancia, la hipótesis de que la mutación era inducida. Este simple experimento resultó la primera demostración de que la mutación precede a la selección, concepto central en la visión moderna del proceso evolutivo. Por añadidura, sus análisis revelaron un método, todavía usado en la actualidad, para evitar el efecto de la expansión clonal a la hora de calcular la tasa de mutación. En 1969, ambos autores serían galardonados con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina.



*Figura 1.2.- La expansión clonal y la frecuencia de mutantes en una población asexual. La figura ilustra el crecimiento por división binaria de dos poblaciones bacterianas durante tres generaciones. Las células grises representan el tipo salvaje, el cual por mutación puede dar lugar a un mutante, representado en rojo. Ambas poblaciones sufren tan sólo una de estas mutaciones. Sin embargo, de forma estocástica, la mutación se produce antes en la población B, dando como resultado un mayor número final de mutantes.*

## 1. 3 Mutadores y espectro mutacional

La idea de que la tasa de mutación pueda presentar variación heredable y esté, por tanto, sujeta a evolución adaptativa ha estimulado el interés de los biólogos evolutivos durante más de ochenta años (Sturtevant 1937). Los primeros trabajos llegaron a la conclusión de que, ya que las mutaciones deletéreas son mucho más probables que las beneficiosas, la tasa de mutación debería evolucionar a un nivel óptimamente bajo que fuera reflejo de esta asimetría (Leigh 1970; Kimura 1967). Sin embargo, la emergencia de estirpes hipermutadoras ocurre con frecuencia en poblaciones bacterianas tanto naturales como de laboratorio, siendo especialmente problemática en el contexto de las enfermedades infecciosas (Shaver y cols. 2002; Oliver y Mena 2010). Estas observaciones han sido entendidas como consecuencia de la selección indirecta sobre alelos mutadores ligados a mutaciones adaptativas, especialmente favorecida en condiciones de asexualidad (Taddei y cols. 1997; Tenaillon y cols. 1999; Sniegowski y cols. 1997). La ocurrencia de este fenómeno es por tanto muy dependiente de la ausencia de transferencia horizontal de genes y de la disponibilidad de mutaciones beneficiosas con efectos considerables en aptitud. Ambas condiciones se cumplen con frecuencia durante la adaptación a un nuevo hospedador o durante la terapia con antibióticos, lo que ha sido utilizado para explicar la prevalencia de estirpes hipermutadoras en poblaciones naturales de diferentes patógenos bacterianos.

Los alelos mutadores suelen ser resultado de la mutación, con pérdida de función, de alguno de los genes que codifican para los sistemas de reparación o prevención de daño del ADN. Ya que no todos estos sistemas contribuyen de igual modo a la tasa de mutación global, ni afectan por igual a todos los tipos mutacionales posibles, su disfunción dará lugar a fenotipos mutadores con tasas de mutación y espectros mutacionales diferentes. En *E. coli* y *P. aeruginosa*, los dos organismos modelo empleados en esta tesis, se han descrito más de treinta genes capaces de albergar alelos mutadores (Miller 1996; Oliver 2010). Entre ellos, destacan los genes del sistema MMR y algunos del sistema GO, ya que son los que con más frecuencia se encuentran alterados en aislados hipermutadores naturales.

El sistema MMR detecta y corrige los errores en la replicación que resultan en el apareamiento erróneo de nucleótidos. La distorsión estructural que éstos provocan permite su reconocimiento por parte de la proteína MutS, paso inicial de esta ruta de reparación (Friedberg y cols. 2006). A continuación, esta proteína recluta y activa, en conjunción con MutL, a la endonucleasa MutH; que introduce muescas en los sitios GATC que se encuentren en un entorno de aproximadamente 1kb del error. Estas muescas permitirán la acción de la helicasa UvrD, que es la que escinde el fragmento

de la hebra naciente que contiene el emparejamiento erróneo. El proceso de reparación se completa por la resíntesis del fragmento de ADN que ha sido escindido. En *E. coli*, donde el sistema está mejor caracterizado, el reconocimiento de la hebra adecuada se basa en la ausencia temporal de grupos metilo en los sitios GATC de la hebra hija, que serán añadidos con posterioridad por la metiltransferasa Dam. La inactivación de alguno de los genes de este sistema (*mutS*, *mutL*, *mutH* y *uvrD*) provoca un aumento en la tasa de mutación de entre dos y tres órdenes de magnitud, con un espectro mutacional sesgado hacia transversiones G:C→A:T y A:T→G:C e indels de diverso número de nucleótidos (Miller 1996). En la tabla 1.1 se muestra la elevación que la inactivación de *mutS* provoca en la frecuencia de mutantes resistentes a diferentes antibióticos. La inactivación de *dam* produce un fenotipo mutador más moderado, ya que el sistema sigue funcionando, aunque menos eficientemente. Muchas especies bacterianas, como p.ej. *P. aeruginosa*, carecen de homólogos de *dam* y *mutH*, por lo que el reconocimiento de la hebra hija debe llevarse a cabo por algún otro tipo de mecanismo, todavía no caracterizado.

<b><u>Estirpe</u></b>	<b><u>Estreptomicina</u></b>	<b><u>Fosfomicina</u></b>	<b><u>Rifampicina</u></b>
<i>E. coli</i> MG1655	5.3x10 <sup>-10</sup>	3.4x10 <sup>-7</sup>	2.6x10 <sup>-8</sup>
<i>E. coli</i> MG1655 <i>mutS</i> <sup>-</sup>	2.8x10 <sup>-8</sup>	7.5x10 <sup>-5</sup>	1.8x10 <sup>-6</sup>
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	9.1x10 <sup>-10</sup>	2.3x10 <sup>-6</sup>	1.5x10 <sup>-8</sup>
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>mutS</i> <sup>-</sup>	1.2x10 <sup>-7</sup>	2.1x10 <sup>-4</sup>	1.6x10 <sup>-6</sup>

*Tabla 1.1- Incremento en la mutagénesis debido a la disfunción de MutS, estimada para dos especies y tres antibióticos utilizados en esta tesis. Las concentraciones de cada antibiótico varían en cada especie (E. coli: Str 100, Fos 50 y Rif 100 µg/ml; P. aeruginosa: Str 1000, Fos 128 y Rif 300 µg/ml). Los datos de E. coli fueron obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, los de P. aeruginosa han sido extraídos de las referencias: Mena y cols. (2008), Montanari y cols. (2007) y Rodríguez-Rojas y cols. (2010). Los datos se refieren al promedio, en todos los casos, con diferente número de réplicas (≥3).*

Como comentamos en el apartado 1.2, una de las lesiones mutagénicas más importantes es la oxidación de la guanina a 8-oxo-guanina, cuya acción mutagénica es prevenida por las diferentes enzimas del sistema GO. La nucleótido trifosfatasa MutT se encarga de eliminar los 8-oxo-GTP (y 8-oxo-dGTP) libres en el citoplasma, mediante la hidrólisis del pirofosfato, para así evitar su incorporación en frente de una adenina del ADN naciente (Friedberg y cols. 2006). Los mutantes defectivos en esta proteína

exhiben una alta tasa de mutación, con un espectro muy específico de transversiones A:T→C:G. El sistema GO está formado por otras dos enzimas, las glicosilasas MutM y MutY, que se encargan de la 8-oxo-guanina incorporada al ADN, excindiéndola de enfrente de citosina y adenina respectivamente. La falta de actividad de cualquiera de estas dos enzimas conlleva un incremento de las transversiones G:C →T:A, aunque los mutantes carentes de MutM presentan un fenotipo mutador débil, mientras que los de MutY son moderados.

## **1. 4 Modelos experimentales usados en esta tesis**

### **1.4.1 El modelo de la resistencia a antibióticos**

Es difícil exagerar el impacto que han tenido los antibióticos. Con su introducción en la práctica médica, tras la Segunda Guerra Mundial, las enfermedades infecciosas dejaron de ser la principal causa de muerte en los países desarrollados (Guyer y cols. 2000). La tuberculosis, por ejemplo, segundo motivo de defunción más común en EEUU antes de los años 40, pasó de ser mortal en el 50% de los casos a serlo en menos del 5% (Maher y Nunn 1998). Mejoras como ésta, junto con el incremento generalizado de las medidas de salud pública, contribuyeron a que la esperanza de vida en los países desarrollados aumentara casi 30 años a lo largo del siglo XX (Yoshikawa 2002).

Menos conocido para el público general es sin duda el papel que los antibióticos han desempeñado, y siguen desempeñando, como herramientas experimentales. Esta utilidad se basa en su capacidad para interferir de forma selectiva con procesos básicos de la fisiología celular, que es lo que justamente les confiere su actividad antibiótica. Un ejemplo paradigmático de esta naturaleza dual es el trabajo de James Park y James Strominger, que en el mismo artículo donde desvelaban que la penicilina actuaba inhibiendo los pasos finales de la síntesis del peptidoglicano -componente fundamental de la pared bacteriana- sugerían, a su vez, cual era la composición química del mismo (Park y Strominger 1957). El conocimiento de la actividad de otros beta-lactámicos sobre las enzimas de síntesis del peptidoglicano permitiría establecer, años más tarde, el papel de éstas en el crecimiento, división y morfología celular (Spratt 1975).

Aparte la pared, otro componente esencial cuya caracterización fue posible gracias a los antibióticos es la ADN girasa, enzima clave en la replicación y transcripción del ADN. Esta enzima está compuesta por dos subunidades, GyrA y GyrB, cada una siendo diana de sendas familias de antibióticos, quinolonas y aminocumarinas (Cozzarelli 1980). La inhibición selectiva provocada por estos

antibióticos permitió discernir la doble función que lleva a cabo esta enzima, por un lado relajando el superenrollamiento positivo que provoca el avance de tanto la maquinaria de replicación como la de transcripción (Gellert y cols. 1977), y por otro, introduciendo el superenrollamiento negativo característico del genoma bacteriano (Gellert y cols. 1976).

Los antibióticos también han prestado una ayuda inestimable para la comprensión del ribosoma, una de las máquinas macromoleculares más complejas de la fisiología celular. De hecho, esta complejidad tanto en términos estructurales como en cuanto a funcionamiento es la que explica la gran cantidad de antibióticos que tienen como diana alguna parte del ribosoma. La formación del enlace peptídico, por ejemplo, central para la función ribosomal, es inhibida por compuestos tales como los anfenicoles, las pleuromutulinas o la puromicina (Poulsen y cols. 2001). Este último compuesto, precisamente, resultó una herramienta clave para demostrar, entre otras cosas, que la actividad peptidil-transferasa reside en la subunidad 50s del ribosoma (Monro 1967) o para caracterizar a los agentes involucrados en la iniciación de la síntesis proteica (Lockwood y cols. 1971).

Otro aspecto de la función ribosomal establecido gracias al concurso de los antibióticos es su influencia sobre la fidelidad de la traducción. En efecto, hasta mediados de la década de los 60, prevalecía la visión de que el ribosoma tan sólo actuaba como un catalizador de los procesos de apareamiento codón-anticodón y de formación del enlace peptídico (Ogle y Ramakrishnan 2005). Sin embargo, la observación de que los aminoglicósidos aumentan substancialmente los errores en la traducción, junto con que algunas de las mutaciones de resistencia tienen justamente el efecto contrario, condujo a la hipótesis de que la subunidad 30s del ribosoma debía tener algún tipo de actividad correctora o decodificadora. Hoy sabemos que esta función reside en el sitio A, cuyas características estructurales dan cuenta de su capacidad para discriminar emparejamientos erróneos entre ARNs mensajeros y transferentes (Ogle y cols. 2001).

Más cerca del ámbito de esta tesis, los antibióticos también han sido ampliamente utilizados como herramientas experimentales en el campo de la genética evolutiva. Esto es debido, por un lado, a que las mutaciones de resistencia a antibióticos son fácilmente caracterizables, y por otro, a que a pesar de ser beneficiosas en presencia del antibiótico, pueden resultar deletéreas en ausencia del mismo. Así, la resistencia a antibióticos ofrece un modelo sencillo para el estudio de mutaciones tanto beneficiosas como deletéreas, protagonistas indiscutibles de la evolución adaptativa. La literatura al respecto es extensa, y se ha incrementado de forma acelerada con el auge de los experimentos de evolución con microorganismos producido a partir de los años

noventa (Buckling y cols. 2009). Por este motivo, en lo que sigue, tan sólo reseñaremos de forma sucinta los trabajos más relevantes en los que han intervenido como modelos experimentales algunos de los antibióticos que han sido empleados en esta tesis.

Los resultados del capítulo III se obtuvieron, en gran medida, mediante el uso de la rifampicina y la estreptomicina, inhibidores respectivamente de la transcripción y la traducción (Hartmann y cols. 1967; Luzzatto y cols. 1968), y con un extenso historial como herramientas en genética evolutiva. Las mutaciones de resistencia a estos antibióticos suelen presentar carácter deletéreo en ausencia del compuesto, ya que las resistencias generalmente se traducen en cambios conformacionales de sus dianas moleculares (la ARN polimerasa y el ribosoma) que alteran en diferente medida su correcto funcionamiento. De hecho, ambos antibióticos han sido ampliamente utilizados como modelos de mutación deletérea desde finales de los años noventa, cuando su uso en una serie de trabajos pioneros permitió desvelar la inesperada capacidad de los genomas para compensar, mediante la adquisición de mutaciones secundarias, los costes de la mutación deletérea (Schrage y Perrot 1996; Björkman y cols. 1998; Reynolds 2000). Su papel ha sido instrumental, también, en el descubrimiento de que la epistasia es muy común entre este tipo de mutaciones (es decir, sus efectos sobre la aptitud no son independientes, sino que interaccionan de forma sinérgica o antagónica) (Trindade y cols. 2009; Ward y cols. 2009). La razón de esta abundancia de relaciones epistáticas todavía no está bien comprendida, aunque recientemente se ha avanzado en la comprensión de las causas moleculares que determinan la epistasia de tipo antagónico, avance en el cual tanto rifampicina como estreptomicina han estado involucradas (Hall, y cols. 2011).

En cuanto a la mutación beneficiosa, la resistencia a rifampicina ha permitido comprobar la predicción teórica de que los efectos en aptitud de las mutaciones beneficiosas siguen una distribución exponencial, con independencia del grado de adaptación del organismo en cuestión (excepto en el extremo donde la aptitud del tipo salvaje está extremadamente comprometida) (MacLean y Buckling 2009). Por otro lado, y de forma un tanto paradójica, la compensación del coste de la resistencia a estos antibióticos se ha establecido como modelo para el estudio de la evolución adaptativa. De esta forma se ha podido establecer cómo la adquisición de mutaciones beneficiosas es un proceso muy dependiente de las condiciones ambientales, el tamaño poblacional y el genotipo de partida (Björkman y cols. 2000; Hall y cols. 2010).

No podríamos dejar de reseñar aquí la importancia de estos antibióticos para la estimación de la tasa de mutación, obtenida a partir de la frecuencia de mutantes resistentes a cualquiera de ambos en una población bacteriana. Como ya hemos visto en el apartado 1.3, la relación entre esta frecuencia de resistentes y la tasa de

mutación es un problema clásico en genética, y es también el asunto sobre el que versa el capítulo II. La estimación de la frecuencia de mutantes resistentes a rifampicina, además, ha sido y es el método estándar para la detección y caracterización de estirpes mutadoras, tanto constitutivas como inducibles (Oliver y cols. 2000; Bjedov y cols. 2003).

Por último, comentaremos el uso del que posiblemente es el modelo de evolución molecular más utilizado en la literatura y que forma parte también del diseño experimental de esta tesis (capítulo IV): la resistencia a cefalosporinas mediada por la beta-lactamasa TEM-1. Las beta-lactamasas son una extensa familia de enzimas capaces de conferir resistencia a antibióticos beta-lactámicos mediante la hidrólisis del anillo beta-lactámico característico de estos compuestos (Frère 1995). La beta-lactamasa TEM-1, en concreto, es una penicilasa muy eficiente que se aisló en 1963 como determinante de resistencia a ampicilina en una paciente griega, de cuyo nombre, Temoniera, proviene su denominación (Datta y Kontomichalou 1965). Aunque esta enzima posee poca o nula actividad frente a cefalosporinas de espectro extendido, puede fácilmente desarrollar esa capacidad con la adquisición de tan sólo unas pocas mutaciones puntuales. De hecho, a partir de los años 80, este tipo de variantes mutadas comenzaron a proliferar en los aislados clínicos, y en la actualidad se han descrito casi 200 alelos de esta enzima con variados perfiles de actividad hidrolítica, constituyéndose en uno de los ejemplos mejor caracterizados de evolución natural de una enzima (Salverda y cols. 2010)

La idoneidad de la beta-lactamasa TEM-1 como sistema modelo para el estudio de la evolución molecular fue tempranamente reconocido por Hall y Knowles (Hall y Knowles 1976). Desde entonces, este modelo ha servido para abordar numerosas preguntas evolutivas que incluyen asuntos tales como la evolución de la robustez frente a la mutación fenotípica (Goldsmith y Tawfik 2009) o los determinantes de la trayectoria mutacional (Hall 2002). Es precisamente este último problema el que motiva el trabajo presentado en el capítulo IV de este manuscrito. Hasta la fecha, se ha descrito que estas trayectorias se ven afectadas, al menos, por la presencia o ausencia de selección fluctuante (Blazquez y cols. 2000) y por la existencia de relaciones epistáticas entre las distintas mutaciones (Weinreich y cols. 2006; Salverda y cols. 2011). En esta tesis describiremos hasta qué punto también el espectro mutacional juega un papel en este asunto.

#### 1.4.2 Dos bacterias ejemplares: *E. coli* y *P. aeruginosa*.

En el desarrollo de esta tesis se han utilizado dos especies bacterianas con una larga

historia como modelos de experimentación. Se trata de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, dos bacilos Gram-negativos usados extensivamente por sus rápidos tiempos de generación, sus poco exigentes requerimientos nutricionales, y por la gran cantidad de herramientas moleculares disponibles para su manipulación y caracterización genética. A modo ilustrativo, una rápida consulta en Science Direct ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)) arroja el dato revelador de que sólo entre los años 2005 y 2010 se han publicado 3731 y 1206 artículos, respectivamente, con las palabras "Escherichia coli" y "Pseudomonas aeruginosa" en el título. No es de extrañar, por lo tanto, que se trate de dos de los organismos mejor conocidos en la actualidad, lo cual facilita enormemente tanto el diseño como la interpretación de cualquier experimento que se lleve a cabo con ellos.

*E. coli* es una  $\gamma$ -proteobacteria con forma de bacilo (Madigan y cols. 2003) con unas dimensiones -en condiciones estándar de laboratorio- de aproximadamente 2-3  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho (Clark y Pazdernik 2012). Posee un único cromosoma circular, cuyo tamaño varía ligeramente entre estirpes. En el caso de la K12, su genoma tiene aproximadamente 4,6 Mb y codifica para unos 4500 genes, de los cuales sólo algo menos del 55% tienen una función fehacientemente establecida (Riley y cols. 2006). Se trata de una de las especies aerobias más comunes del intestino de los mamíferos, el cual coloniza a las pocas horas del parto (Manning y Babcock 2010). Allí, establece una relación de mutualismo con su portador que raramente se ve truncada, salvo en individuos inmunocomprometidos o en caso de lesiones que permitan el acceso a otros tejidos (Kaper y cols. 2004). Sin embargo, mediante la adquisición de factores de virulencia, varias cepas de esta bacteria pueden convertirse en patógenas, en ocasiones terribles, como hemos podido comprobar recientemente con el brote del síndrome urémico hemolítico de 2011 en Alemania (Bezuidt y cols. 2011). Estas cepas patógenas pueden provocar una variedad de enfermedades, típicamente diarrea, septicemia, meningitis o gastroenteritis (Kaper y cols. 2004). Especialmente reseñables son las infecciones del tracto urinario, donde *E. coli* es responsable de hasta un 70% de los casos (Kahlmeter y cols. 2003).

La primera descripción de *E. coli* se remonta a 1886, en una monografía sobre la relación de las bacterias intestinales con la digestión del infante, firmada por el bacteriólogo alemán Theodor Escherich. En ella, el alemán describía una bacteria a la que bautizó como "Bacterium coli commune"; la cual, más tarde, sería rebautizada en su honor como "Escherichia coli". En lo que a esta tesis se refiere, las estirpes aquí utilizadas son todas derivadas de la cepa conocida como *E. coli* K-12, aislada en 1922 de las heces de un paciente de difteria en Palo Alto, California (Lederberg y Lederberg 1952). Esta cepa fue utilizada con fines docentes en el Departamento de Bacteriología



de la Universidad de Stanford hasta 1940, cuando Edward Tatum comenzó a utilizarla en sus investigaciones sobre el control genético del metabolismo (Neidhardt y cols. 1987). Utilizando esta cepa, Tatum y su estudiante Joshua Lederberg describirían por primera vez la conjugación bacteriana, lo cual le valdría a este último para obtener no sólo su doctorado sino también, posteriormente, el Premio Nobel (Weissmann 2010). Este descubrimiento, junto con los de la transducción tanto generalizada (Lennox 1955) como especializada (Morse y cols. 1956), catapultarían a esta cepa a la fama mundial, permitiéndole jugar a partir de ese momento un papel preponderante en el desarrollo de campos como la genética, la biología molecular o la biotecnología (Schaechter 2001)

Por su parte, *P. aeruginosa*, es también una  $\gamma$ -proteobacteria con forma de bacilo y posee un tamaño que oscila en torno a los 1-5  $\mu\text{m}$  de largo por 0,5-1  $\mu\text{m}$  de ancho (Madigan y cols. 2003). El tamaño de su genoma varía sensiblemente entre estirpes, desde 5.2 a 7 Mbp (Klockgether y cols. 2010). En el caso de la estirpe PA14, empleada en esta tesis, sus 6.5 Mbp codifican cerca de 6000 genes cuya función está sólo establecida en menos del 27% de los casos (Lee y cols. 2006). Bacteria de vida libre, presente tanto en hábitats acuáticos (marinos y dulces) como terrestres, es capaz de infectar a plantas y a animales (Falkow y cols. 2006). En humanos es considerada patógena oportunista constituyendo uno de los agentes más frecuentemente involucrados en infecciones nosocomiales, particularmente en las unidades de cuidados intensivos (Livermore 2002). Debido a su gran capacidad para desarrollar resistencia múltiple a antibióticos, resulta especialmente problemática en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas, como la bronquiectasia o la fibrosis quística, donde se considera el principal agente determinante de tanto morbilidad como mortalidad (Livermore 2002).

*P. aeruginosa* fue aislada por primera vez en 1882 por el farmacéutico francés Carle Gessard, que describió el aislamiento de un organismo que teñía los vendajes de una llamativa coloración azul-verdosa. Hoy sabemos que esta característica coloración se debe a la producción de un pigmento hidrosoluble denominado piocianina, compuesto heterocíclico de la familia de las fenazinas (Frank y DeMoss 1959), que constituye un importante factor de virulencia debido a su efecto citotóxico sobre las células eucariotas (Ran y cols. 2003). De hecho, el epíteto específico 'aeruginosa' hace todavía referencia a este pigmento, ya que en latín se conocía como 'aerugo' a la pátina de color verde-azulado que se forma sobre el cobre oxidado (Villavicencio 1998).

En la actualidad, *P. aeruginosa* es ampliamente utilizada como organismo modelo para el estudio de la interacción patógeno-hospedador, de la formación de biopelículas o de la emergencia de la resistencia múltiple a antibióticos (Ramos y Filloux 2007). En esta tesis, en concreto, hemos utilizado la cepa PA14, aislada

originalmente en la Universidad de Berkeley a partir de las heridas un paciente quemado (Rahme y cols. 1995).

### 1.4.3 Experimentos de evolución con microorganismos

Al igual que sucede con otras disciplinas como la astronomía, la geología o la lingüística, la evolución ha sido considerada tradicionalmente una ciencia histórica, donde la imposibilidad de realizar experimentos obliga a que las hipótesis sólo puedan contrastarse con observaciones naturales (Cleland 2001). En efecto, el desarrollo de la biología evolutiva se ha basado fundamentalmente en el estudio comparativo de organismos contemporáneos y en el análisis del registro fósil (Elena y Lenski 2003), jugando el método experimental un papel minoritario hasta el *boom* de experimentos de evolución con microorganismos de los años 90 (Buckling y cols. 2009).

Aunque gran variedad de organismos pueden ser sometidos a evolución experimental, los microbios son sin duda los organismos modelos por antonomasia, consecuencia de al menos tres grandes ventajas que facilitan este tipo de experimentos (Elena y Lenski 2003). En primer lugar, sus dimensiones reducidas permiten mantener poblaciones de cientos de millones de individuos en un simple matraz de laboratorio, y por lo tanto proveer a la selección natural de una ingente cantidad de diversidad genética. En segundo lugar, su corto ciclo de vida hace que el transcurso de unos pocos días signifique decenas de generaciones, permitiendo observar en un plazo razonable de tiempo la acumulación de múltiples cambios adaptativos. Por último, resulta posible hacer comparaciones directas entre miembros con diferentes estadios evolutivos de un mismo linaje, debido a que la mayor parte de los microbios pueden ser almacenados en animación suspendida mediante congelación o liofilización.

La referencia más antigua del uso de microorganismos como modelo para la evolución experimental puede remontarse hasta los tiempos del propio Darwin, cuando William Dallinger, reverendo y director de la *Royal Microscopical Society* británica, se preguntó si sería posible manipular el medio ambiente para inducir cambios adaptativos en lo que él denominaba 'formas de vida diminutas' (Dallinger 1878). Para ello, expuso en el laboratorio poblaciones de protozoos a temperaturas paulatinamente crecientes. Al cabo de los meses, Dallinger obtuvo poblaciones capaces de crecer a 65°C y que además habían perdido la capacidad de crecer a la temperatura original, lo que interpretó como una evidencia experimental a favor de la selección natural. En una carta fechada en 1878, Dallinger le decía a Darwin que estos resultados 'demostraban palpablemente' su teoría. Sin embargo, las limitaciones técnicas y el absoluto desconocimiento que existía en aquella época sobre los mecanismos de la herencia

hacían imposible demostrar que la adaptación a la temperatura era debida a la selección natural, y no a algún mecanismo no heredable de adaptación fisiológica. Como consecuencia, a pesar de despertar el interés del propio Darwin, el trabajo de Dallinger nunca tuvo la repercusión que cabría esperar, y pronto fue olvidado.

De hecho, tuvo que pasar más de un siglo hasta que la disponibilidad de herramientas tanto genéticas como conceptuales alumbraran una explosión en el uso de experimentos de evolución con microorganismos (Buckling y cols. 2009). Antes de la década de los 90, la evolución experimental se había limitado básicamente a experimentos de selección artificial sobre caracteres cuantitativos, principalmente con la mosca de la fruta (Mackay 1996), o los experimentos de mutación y selección con microorganismos que siguieron a la introducción del quimiostato (Dykhuizen y Hartl 1983). Sin embargo, a partir simbólicamente del año 1991, año en el cual se publican los primeros resultados del influyente experimento de evolución a largo plazo de Richard Lenski (Lenski y cols. 1991), el número de publicaciones que hacen uso de esta metodología comienza un marcado ascenso, lo que ha llevado a la evolución experimental a ser considerada, en la actualidad, una disciplina en sí misma (Buckling y cols. 2009).

Como era de esperar, la posibilidad de generar observaciones a la carta que supone el método experimental ha contribuido notablemente a incrementar nuestro conocimiento de los procesos evolutivos. Dado el volumen de la literatura y el carácter introductorio de este apartado, tan sólo discutiremos aquí, de forma muy somera, las tres grandes áreas en las que a nuestro juicio se pueden clasificar los aportes más significativos que ha dado hasta la fecha la evolución experimental.

Un primer gran bloque, entendido de manera general, hace referencia a las bases genéticas de la adaptación. Gracias al acceso generalizado a herramientas moleculares, como la PCR o el método Sanger, que se produjo a partir de los años 90, ha sido posible identificar por primera vez muchas de las mutaciones responsables de determinados caracteres adaptativos. Este proceso se ha acelerado en los últimos años con la irrupción de las técnicas de secuenciación masiva, lo que ha permitido conocer con gran detalle tanto el tipo como la frecuencia de los diferentes eventos moleculares responsables en última instancia de la adaptación (Dettman y cols. 2012). Como resultado, se ha podido acumular una enorme cantidad de evidencia a favor de uno de los conceptos centrales de la Síntesis Moderna: el cambio evolutivo como resultado de la acción de la selección natural sobre la variación heredable (Futuyma 2009). En muchos casos, además, se ha logrado alcanzar una comprensión mecanicista de cómo un determinado evento molecular se traduce en un fenotipo ventajoso, como por ejemplo substituciones en determinados residuos de la porina OmpF en poblaciones de

*E. coli* propagadas en escasez de lactosa, que al facilitar la difusión del disacárido confieren ventaja respecto al ancestro (Zhang y Ferenci 1999).

Este conocimiento de los detalles moleculares de la adaptación ha revelado también aspectos sorprendentes. Por ejemplo, el descubrimiento de que muchas de las mutaciones adaptativas afectan a genes reguladores (Philippe y cols. 2007), ha señalado la relevancia de la arquitectura de los genomas en el proceso evolutivo: la organización fuertemente jerárquica de las redes de transcripción favorece que una única mutación en un gen regulador pueda afectar la función de numerosos genes y por tanto tener grandes efectos fenotípicos (Martínez-Antonio y Collado-Vides 2003). Otros descubrimientos importantes han sido la omnipresencia de interacciones epistáticas entre mutaciones beneficiosas (Cooper y cols. 2008; Chou y cols. 2011; Khan y cols. 2011) o la abundancia de compromisos funcionales entre fenotipos (Blazquez y cols. 2000; Cooper y Lenski 2000; Notley-McRobb y cols. 2002). Todas estas observaciones han supuesto un nuevo estímulo al clásico debate sobre la reproducibilidad de la evolución (Gould 1991; Travisano y cols. 1995). En conjunto, han subrayado la importancia de la implementación genética como canalizadora de las trayectorias evolutivas, explicando en parte el sorprendente grado de convergencia que ha sido observado en numerosos ejemplos de evolución experimental (Wichman y cols. 1999; McDonald y cols. 2009; Tenaillon y cols. 2012)

Un segundo bloque de aportaciones hace referencia a la dinámica de la adaptación. Desde la década de los 50 la adaptación en poblaciones asexuales era entendida según el modelo de 'selección periódica', donde cada cierto tiempo una mutación beneficiosa produce un 'barrido selectivo' que purga toda la diversidad genética presente en la población (Atwood y cols. 1951). Además de esta purga, el modelo predecía que a) la aptitud promedio aumenta de forma escalonada, b) la tasa de adaptación es proporcional a la producción de mutaciones beneficiosas y c) cada clon dominante desciende directamente del clon dominante anterior. Ya en la década de los 90, los primeros resultados del experimento de Lenski fueron consistentes con la predicción a) y por lo tanto se interpretaron como resultado de la selección periódica (Elena y Lenski 2003). Sin embargo, posteriores análisis del mismo experimento, junto con resultados de otros trabajos, resultaron incompatibles con las predicciones b) y c) (Wichman y cols. 1999; Miralles y cols. 1999). Para dar cuenta de estas observaciones se propuso el modelo de 'interferencia clonal', según el cual varios barridos selectivos, iniciados por diferentes mutaciones beneficiosas, pueden coexistir temporalmente (de Visser y cols. 1999). Esta concurrencia supone la pérdida de la mayoría de las mutaciones beneficiosas, ya que sólo el barrido selectivo iniciado por la mutación más ventajosa acabará por completarse. Como consecuencia, la tasa de adaptación no

aumenta linealmente con el tamaño de población y la tasa de mutación, estableciéndose un 'límite de velocidad' para la evolución asexual. Trabajos más recientes han introducido una capa extra de complejidad a esta dinámica, al mostrar experimentalmente que los clones contendientes pueden sufrir nuevas mutaciones beneficiosas durante un barrido selectivo (Desai y cols. 2007; Bollback y Huelsenbeck 2007). La importancia relativa de este fenómeno permanece en la actualidad como un debate abierto (Sniegowski y Gerrish 2010; Lang y cols. 2011).

La evolución experimental también ha permitido comprobar varias de las hipótesis que clásicamente habían sido postuladas para explicar la ventaja del sexo. Por un lado, se ha demostrado que el sexo aumenta la eficiencia de la selección a la hora de eliminar mutaciones deletéreas, lo que en última instancia disminuye la carga mutacional (Zeyl y Bell 1997) y minimiza la pérdida de aptitud provocada por el trinquete de Müller (Chao 1990). Por el otro, también se ha demostrado que el sexo puede incrementar la tasa de adaptación al proporcionar mayor variabilidad genética (Goddard y cols. 2005) y reducir la interferencia clonal (Colegrave 2002). En relación a esto último, también se ha demostrado que la recombinación mediada por plásmidos es capaz de relajar el 'límite de velocidad' impuesto por la interferencia clonal en bacterias (Cooper 2007).

El último gran bloque correspondería a la ecología evolutiva, dentro del cual probablemente la cuestión que más interés ha recibido es la del mantenimiento de la diversidad. Una de los conceptos fundamentales en la teoría ecológica es el principio de exclusión competitiva (o ley de Gause), que prohíbe que varios competidores puedan coexistir establemente en un mismo nicho, ya que en última instancia el mejor de los competidores acabará por desplazar al resto (Kassen y Rainey 2004). La evolución experimental con microorganismos ha permitido comprobar la hipótesis de que la heterogeneidad ambiental, al proporcionar diferentes nichos, permite la coexistencia de varios especialistas; tanto en el caso de heterogeneidad espacial (Rainey y Travisano 1998) como temporal (MacLean 2005). Las bases genéticas de la evolución de estos especialistas ha sido además comprendidas con un alto grado de detalle (McDonald y cols. 2009; MacLean 2005). Ahora bien, de forma sorprendente, diferentes grupos han encontrado que la coexistencia también es posible en ambientes homogéneos (Helling y cols. 1987; Rosenzweig y cols. 1994; Maharjan y cols. 2006). Estas observaciones se han explicado mayoritariamente como consecuencia de la emergencia de comensalismo, un tipo de interacción ecológica donde un competidor se especializa en explotar los productos de excreción de otro, lo que supone la creación de nuevos nichos por parte de los propios organismos (Rosenzweig y cols. 1994; Pfeiffer y Bonhoeffer 2004). La evolución de comensalistas también se ha observado en ambientes heterogéneos,

aunque su papel en estos casos parece ser más limitado (Turner y cols. 1996; Rozen y Lenski 2000).

Los experimentos de evolución experimental que se han llevado a cabo en esta tesis tienen su referente conceptual en los trabajos de Barry Hall (Hall 2002) y Daniel Weinreich (Weinreich y cols. 2006). Como ya se ha comentado en el apartado 1.5.1, estos trabajos trataban de estudiar la naturaleza de las trayectorias mutacionales que subyacen a la evolución en presencia de cefotaxima de la beta-lactamasa TEM-1. Si bien éste era también un objetivo compartido por nosotros, nuestro estudio presenta al menos dos diferencias fundamentales. En primer lugar, nuestro interés principal se centró en el papel del espectro mutacional como determinante de los caminos evolutivos. La segunda diferencia es metodológica. Los trabajos de Hall y Weinreich consisten en una serie de predicciones teóricas sobre la evolución de esta enzima, basadas en la caracterización fenotípica de una colección de mutantes de la misma; pero en ningún momento comprobadas mediante evolución experimental. En este sentido, nuestro enfoque es similar al empleado por Blázquez (Blazquez y cols. 2000), donde se monitorizó la evolución de la resistencia exponiendo poblaciones bacterianas a concentraciones crecientes de antibiótico. Como se discute en el capítulo 4, esta diferencia metodológica es la principal responsable de la discrepancia entre nuestros resultados y las predicciones hechas por Hall y, especialmente, Weinreich.

#### 1.4.4 Modelos experimentales *in silico*

En las últimas décadas los experimentos *in silico*, o simulaciones por ordenador, se han convertido en una herramienta fundamental para la investigación en campos tan diversos como la sociología (Silverman y Bryden 2007), la meteorología (Gillett y Thompson 2003) o la física de partículas (Gerritsma y cols. 2010). También comprenden una parte importante de esta tesis, y es por ello que consideramos oportuno añadir este apartado donde describiremos sucintamente esta metodología, así como los antecedentes directos a los modelos aquí utilizados.

Conceptualmente se pueden distinguir, al menos, dos grandes tipos de simulaciones por ordenador. El primer tipo, generalmente conocido como simulaciones numéricas, consiste en la exploración, mediante el uso de diferentes métodos computacionales, de modelos matemáticos cuya resolución analítica resulta impracticable (Peck 2004). El segundo tipo, al que aquí nos referiremos con el nombre genérico de simulaciones, consiste en la construcción y análisis de sistemas experimentales virtuales donde los elementos y reglas de comportamiento tratan de emular la dinámica del sistema real que se pretende estudiar (Gould y cols. 2006). Este

segundo tipo de simulaciones es el que ha sido utilizado a lo largo de esta tesis y por tanto será en el que nos centremos aquí.

A pesar de que su uso se asocia generalmente con el trabajo teórico, las simulaciones por ordenador poseen muchos más elementos en común con los experimentos convencionales que con los modelos matemáticos. La similitud más profunda se da a nivel epistemológico, puesto que las simulaciones, al igual que los experimentos, obtienen el conocimiento a partir de observaciones y mediante la inducción. Esto se contrapone al proceder de las matemáticas, donde el conocimiento se obtiene mediante la deducción partiendo de axiomas y definiciones (Winsberg 2010). Como consecuencia, tanto simulaciones como experimentos comparten el imperativo metodológico de las réplicas y los controles, indispensables para poder trazar relaciones de causalidad entre los diferentes elementos del sistema. Todas estas similitudes han llevado a un reciente interés, dentro de la filosofía de la ciencia, por el estudio de las simulaciones como un nuevo tipo de sistema experimental (Peck 2004)

Los experimentos simulados ofrecen dos grandes ventajas sobre los reales: por un lado permiten realizar observaciones con una menor inversión de tiempo y dinero, y por otro permiten hacerlo en circunstancias donde los experimentos reales no resultarían factibles. Ahora bien, esta mayor facilidad para generar observaciones se consigue a costa de introducir un mayor número de asunciones y simplificaciones que las que generalmente se incluyen en los experimentos convencionales. Debido a esto, los resultados obtenidos mediante simulaciones exigen de un grado prudencia mayor: la omisión de un detalle importante o la inclusión de uno arbitrario pueden conducir tanto a extrapolaciones erróneas como a conclusiones incorrectas sobre el papel de los diferentes parámetros y variables del sistema (Gudelj y cols. 2010; Canham y cols. 2003).

Las primeras simulaciones por ordenador se llevaron a cabo dentro del proyecto Manhattan, en el Laboratorio Nacional de Los Álamos en EEUU, a finales de la Segunda Guerra Mundial. El matemático John von Neumann y sus colaboradores tuvieron la idea de utilizar una de las primeras computadoras electrónicas, recién construida en la Universidad de Pensilvania, para modelizar la reacción termonuclear, problema que se resistía al abordaje analítico (Winsberg 2010). Tras el fin de la contienda, von Neumann pensó que este nuevo método podía también aplicarse a otros sistemas complejos, y bajo su dirección se puso en funcionamiento el primer proyecto de investigación dedicado exclusivamente a las simulaciones por ordenador, en el Instituto de Estudios Avanzados de la Universidad de Princeton, con el objetivo principal de modelizar el clima. Como resultado, en 1956 Norman Phillips sacó a la luz el primer modelo de simulación de la circulación atmosférica, cuyo éxito al reproducir patrones

de viento, presión y temperatura supuso el pistoletazo de salida de la moderna ciencia climática (Lenhard y cols. 2007).

En menos de una década, y con las mejoras tanto en los equipos como en los lenguajes de programación, el uso de las simulaciones por ordenador se extendió rápidamente a otros campos de la ciencia. Por citar tan sólo algunos ejemplos, los años sesenta vieron los primeros modelos de simulación de sistemas ecológicos (Garfinkel 1962), galaxias (Aarseth 1963), procesos sociales (Coe 1964), epidemias (Black y Gay 1965), neuronas (Andersen y cols. 1966) o redes de regulación genética (Kauffman 1969). Más relacionado con el ámbito de esta tesis, no podemos dejar de reseñar el trabajo de Bill Hill y Alan Robertson (Hill y Robertson 1966), que describieron utilizando simulaciones por ordenador cómo el sexo incrementa la tasa de adaptación al combinar en un mismo genoma mutaciones beneficiosas, que de otra forma tendrían que competir hasta que una eliminase a la otra.

Los primeros intentos de simular la evolución darwiniana por ordenador fueron llevados a cabo, también, en el Instituto de Estudios Avanzados de la Universidad de Princeton. El matemático Nils Aall Barricelli, inspirado por las ideas del propio von Neumann sobre la posibilidad de crear un dispositivo capaz de hacer copias de sí mismo, creó un programa de ordenador donde las filas de una matriz de números se iban 'reproduciendo' de arriba abajo de acuerdo con ciertas reglas, incluyendo la mutación (Barricelli 1957). A pesar de lo rudimentario de su modelo, Barricelli encontró dinámicas que consideró similares a fenómenos biológicos como el parasitismo,

la exclusión competitiva o la simbiosis, a la que concedió gran importancia. Los trabajos de Barricelli se cuentan como los primeros intentos de crear vida artificial, algo que en la actualidad se ha constituido como una disciplina en sí misma, sobre todo a partir de la irrupción en los años 90 de las plataformas Tierra (Ray 1991) y sobre todo, Avida (Adami 1998). En estos sistemas, programas de ordenador compiten por el uso del microprocesador para hacer copias de sí mismos. Estos programas mutan y por lo tanto evolucionan (Wilke y cols. 2001), y han sido extensivamente utilizados para estudiar fenómenos como la epistasia (Wilke y Adami 2002), la robustez frente a mutaciones (Lenski y cols. 1999), la evolución de la complejidad (Lenski y cols. 2003) o la radiación adaptativa (Chow y cols. 2004).

En esta tesis, en concreto, se han usado básicamente dos tipos de modelos. El primero, cuyos precedentes son los trabajos de Koch (Koch 1982) y, especialmente, el de Stewart (Stewart 1994) consiste en la simulación de un experimento de estimación de tasa de mutación en bacterias, mediante el método de fluctuación. Koch utilizó por primera vez un ordenador para implementar el algoritmo propuesto por Lea y Coulson



(Lea y Coulson 1949) que permite generar de forma aproximada la distribución del número de mutantes por cultivo. Su objetivo era doble: por un lado, ofrecer unos valores de referencia más extensos y precisos con los que comparar resultados experimentales y calcular la tasa de mutación; y por el otro, ofrecer valores de referencia para los casos donde se violaban dos de las asunciones de Lea y Coulson: la diferencia de tasa de crecimiento entre mutante y parental, y la existencia de retraso fenotípico. Mientras que Koch básicamente se ocupó de generar distribuciones de Luria y Delbrück más precisas y realistas, Stewart, 12 años más tarde, estudió mediante simulaciones cómo el error experimental podría afectar a las estimaciones hechas a partir de un número finito de muestras. En concreto, se propuso evaluar cual de los estimadores de tasa de mutación más comunes era el más eficiente teniendo en cuenta el error de muestreo. Los trabajos de Stewart incluyen por tanto dos modelos de simulación, uno donde se generan distribuciones de Luria y Delbrück (utilizando el algoritmo propuesto por Ma, Sandri y Sarkar (Sarkar y cols. 1992) en vez del de Lea y Coulson) y otro donde se simula el proceso de muestreo experimental con un número variable de cultivos (de 16 a 128). El modelo presentado en el capítulo 1 de esta tesis extiende el trabajo de Stewart para evaluar casos con bajo número de réplicas (menos de 4 cultivos). Además, gracias al incremento en la potencia de los ordenadores, la generación del número de mutantes por cultivo se ha podido hacer mediante simulaciones explícitas, donde bacterias simuladas crecen y mutan en un matraz virtual, en vez de utilizar métodos numéricos con un número mayor de asunciones como los de Lea y Coulson o Ma, Sandri y Sarkar. Este modelo del matraz virtual ha sido también empleado en el capítulo 2 para estudiar el efecto de la expansión clonal sobre la diversidad genética.

El segundo tipo de modelo de simulación utilizado en esta tesis, cuyos precedentes son los trabajos de Taddei (Taddei y cols. 1997) y Tenaillon (Tenaillon y cols. 1999), consiste en la simulación de un experimento de evolución donde una población de bacterias se adapta a un nuevo medio ambiente. Ambos trabajos tenían el objetivo de estudiar el impacto y evolución de estirpes mutadoras, siendo en realidad el de Tenaillon y cols. una extensión del trabajo Taddei y cols. en el que se utiliza una versión más sofisticada del mismo modelo. En éste, cada población es fundada por una única célula cuyo genotipo requiere de un número determinado de mutaciones beneficiosas para alcanzar la máxima adaptación al nuevo medio. Estas mutaciones beneficiosas, al igual que las deletéreas, se producen con cierta probabilidad en cada generación. Asimismo, pueden aparecer por mutación individuos mutadores, cuya tasa de mutación se incrementa por cierto factor. El tamaño de la población se mantiene constante mediante un muestreo con selección en función del número de mutaciones

beneficiosas y deletéreas que haya ido acumulando cada genotipo. Este esquema general de funcionamiento es también el que opera en el modelo que ha sido utilizado en el capítulo 3 de esta tesis, aunque con al menos tres diferencias importantes que señalaremos a continuación. En primer lugar, y gracias también a la mayor potencia computacional a la que hemos tenido acceso una década después, tanto la deriva como la selección ha sido tratadas de forma explícita: cada genotipo se reproduce de acuerdo a una tasa de crecimiento determinada por su genotipo, y cuando la población llega a un tamaño máximo sufre un drástico cuello de botella que da lugar a una nueva fase de crecimiento. La tercera y última diferencia radica en que en nuestro modelo mutadores y no mutadores tienen acceso a mutaciones beneficiosas con diferentes ventajas adaptativas, lo que es debido a que ése era precisamente el factor cuya relevancia estábamos interesados en analizar.

## **2 Objetivos de la investigación**

A continuación se detallan los objetivos que se pretendieron alcanzar con la realización de esta tesis:

- I. Validación estadística de los estimadores de tasa de mutación más empleados en experimentos con bajo número de réplicas (Capítulo 3).
- II. Análisis del efecto de la expansión clonal sobre la diversidad genética de poblaciones bacterianas (Capítulo 4).
- III. Estudio del impacto del espectro mutacional en la selección indirecta de estirpes hipermutadoras (Capítulo 5).
- IV. Determinación del papel del espectro mutacional en la repetibilidad de la evolución de resistencia a antibióticos (Capítulo 6).



# 3 Estimación de la tasa de mutación con bajo número de réplicas

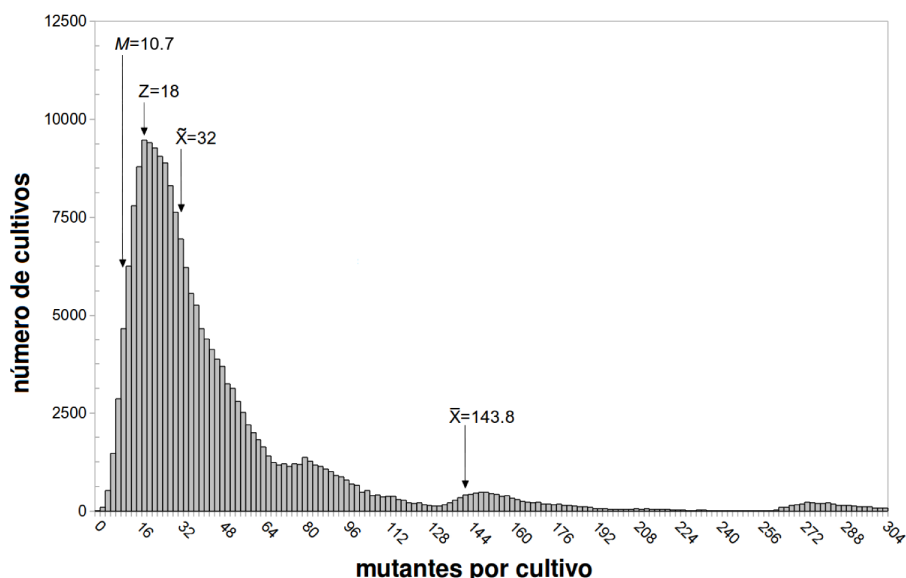
## 3.1 Introducción

La estimación de la tasa de mutación en cultivos celulares es una técnica clave para numerosas disciplinas, algunas con gran relevancia social como la oncología o las enfermedades infecciosas; por lo que no es extraño que el volumen de la literatura dedicado a la mejora de esta metodología sea extenso. Aunque no la única posible, la aproximación más habitual a este problema consiste en el llamado análisis de experimentos de fluctuación, propuesto originalmente por Luria y Delbrück (Luria y Delbrück 1943). Este tipo de experimentos involucran el crecimiento en paralelo de un número variable de cultivos independientes y su posterior exposición a un agente selectivo que permita aislar mutantes. La distribución del número de estos mutantes se usa entonces para inferir el número más probable de mutaciones por cultivo ( $m$ ), que permitirá el cálculo de la tasa de mutación mediante su simple división por el tamaño estimado de la población total (Foster 2006).

Como ya se ha discutido en el apartado 1.3, la expansión clonal de los mutantes tempranos hace que la relación entre la frecuencia de mutantes y el número de mutaciones no sea trivial. Así, los análisis de fluctuación se basan en las propiedades de la distribución teórica de mutantes por cultivo derivada por Lea y Coulson (Lea y Coulson 1949), y en las extensiones de ésta que se han producido con el transcurso de los años (Gerrish 2008). Debido a que estos métodos extraen la información de la distribución observada de mutantes, el diseño experimental habitualmente implica el uso de un alto número de réplicas, en el orden de varias decenas. En la actualidad, los dos estimadores empleados de forma más común son probablemente el de la mediana de Jones (Jones y cols. 1994) y el del valor más probable de Ma, Sandri y Sarkar (MSS) (Sarkar y cols. 1992). Los pros y contras de estos estimadores, así como de otros que han caído más o menos en desuso, pueden consultarse en la reciente revisión de Foster (Foster 2006).

A pesar del alto grado de eficiencia que han alcanzado los análisis de fluctuación, es muy habitual encontrar en la literatura trabajos que, en vez de estimar la tasa de mutación con alguno de estos métodos, se limitan tan sólo a ofrecer algún promedio de la frecuencia de mutantes (Hall y Henderson-Begg 2006). Tradicionalmente, esta práctica se ha asociado con situaciones donde el

experimentador se ve obligado a emplear un número limitado de réplicas, ya sea por razones de tiempo, dinero o escasez de muestras. La asunción implícita es que los análisis de fluctuación pierden validez en estas circunstancias; aunque el hecho es que a día de hoy este extremo todavía no ha sido evaluado rigurosamente.



*Figura 3.1.- Distribución simulada del número de mutantes por cultivo, mostrando los valores de algunos descriptores estadísticos. Con una tasa de mutación de  $8 \times 10^{-8}$  y un tamaño poblacional de  $1.3 \times 10^8$  el número promedio de mutaciones por cultivo fue  $m=10.7$ . Los mutantes por cultivo que igualan este número, y que por tanto permitirían estimar la tasa de mutación auténtica se denota en la figura como  $M$ . Este valor cae en la cola izquierda de la distribución, por debajo de la mediana ( $\tilde{X}$ ) o incluso la moda ( $Z$ ), lo que significa que la mayor parte de los cultivos darán una sobrestimación de la tasa de mutación. La media poblacional ( $\bar{X}$ ), el estimador más común de tasa de mutación, cae muy alejada de este valor ideal. Los métodos de fluctuación fueron desarrollados a propósito para tratar con este tipo de datos. Las ondulaciones de la cola derecha son consecuencia de que el tamaño de cualquier clon puede sólo tomar potencias de dos, lo que provoca que algunos valores de mutantes por cultivo sean más frecuentes que otros.*

El uso de la frecuencia de mutantes se ha beneficiado también de la concepción errónea de que ésta tiende únicamente a sobrestimar la tasa de mutación, siendo por tanto problemática sólo en los casos donde el investigador está interesado en obtener valores absolutos, y no cuando los que se busca es hacer comparaciones relativas. Desafortunadamente, además de poca precisión, la frecuencia de mutantes presenta también una baja reproducibilidad; esto es, la tendencia de medidas consecutivas a ofrecer valores similares bajo circunstancias idénticas. Esta característica hace que la

frecuencia de mutantes tampoco sea apropiada en los casos donde el interés se centra en la variación relativa de la tasa de mutación de un control frente a una determinada condición experimental.

En cualquier caso, el promedio de frecuencia de mutantes que goza de mayor popularidad es la media aritmética, a pesar de haber sido muy criticado desde los tiempos de Lea y Coulson debido a su extrema sensibilidad frente a la asimetría de la distribución de mutantes por cultivo (Foster 2006). Para evitar este problema, muchos autores han optado por emplear en su lugar medidas de tendencia central más robustas frente a este tipo de datos, especialmente la media geométrica o la mediana (Ciofu y cols. 2010; Sanders y cols. 2009). Otra alternativa ha sido eliminar los valores extremos (Kenna y cols. 2007), que corresponderían a cultivos donde alguna mutación se ha producido muy temprano, aunque el problema aquí es que la decisión de qué datos deben considerarse como extremos presenta un alto grado de arbitrariedad (Pope y cols. 2008).

En este trabajo nos hemos planteado evaluar cual de los promedios de frecuencia de mutantes empleados en la literatura es el más eficiente en términos de precisión y reproducibilidad. Asimismo, hemos querido realizar un análisis comparativo entre comportamiento de estos métodos y los de fluctuación en experimentos con número limitado de réplicas, bajo la hipótesis de que su veto en estas circunstancias carece de fundamento.

## **3. 2 Materiales y métodos**

A grandes trazos, nuestro enfoque experimental puede describirse como sigue. Primero, hemos implementado un modelo computacional que simula el crecimiento y la expansión clonal de una población bacteriana. Este modelo se ha utilizado para construir diez distribuciones de mutantes por cultivo; cada una con una tasa de mutación diferente, manteniendo constante el tamaño poblacional. Segundo, hemos implementado otro programa que simula la extracción de cierto número de valores de esas distribuciones, y la posterior aplicación de los diferentes estimadores de tasa de mutación sobre los mismos. El rango del número de valores (réplicas) considerado ha sido de uno a cuatro. Por último, desarrollamos un tercer programa que permitió evaluar las estimaciones obtenidas en cuanto a su precisión (siendo comparadas con la tasa de mutación correspondiente) y a su reproducibilidad (siendo comparadas con el resto de valores de su misma distribución). El primero de los modelos computacionales ha sido programado en R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), mientras que los otros dos fueron

programados en FORTRAN ([gcc.gnu.org/fortran](http://gcc.gnu.org/fortran)). A continuación, se ofrece una descripción más detallada de cada uno de estos tres programas.

### 3.2.1 Simulación del crecimiento y expansión clonal

El algoritmo creado para generar las distribuciones de mutantes por cultivo que pueden verse en la figura 3.2 se hizo siguiendo las asunciones del modelo de Lea y Coulson (Lea y Coulson 1949). Básicamente, cada población es fundada por una única célula no mutante, y el tamaño poblacional se duplica consecutivamente hasta superar un tamaño de  $1.3 \times 10^8$  individuos, lo que equivaldría a 27 generaciones de división binaria. Cada división de una célula no mutante lleva asociada una probabilidad (la tasa de mutación) de generar una célula mutante. El número de mutaciones es calculado mediante un generador de números pseudoaleatorios distribuidos según una distribución de Poisson, intrínseco al compilador de R. Los argumentos de este generador son el tamaño de la población no mutante y la tasa de mutación por célula y división, que actúa como el parámetro de la distribución de Poisson. Por simplicidad, la reversión y la muerte no fueron consideradas, todos los mutantes fueron detectados en la población final y se impuso la misma la tasa de crecimiento tanto para mutantes como para no mutantes. Se exploraron diez valores de tasa de mutación, empezando con  $1 \times 10^{-8}$  y duplicando este valor hasta llegar a  $5.12 \times 10^{-6}$ . Con un tamaño poblacional final de  $1.3 \times 10^8$  individuos, estos valores produjeron promedios de mutantes por cultivo entre 1.3 y 688. Las distribuciones correspondientes a cada una de esas tasas de mutación fueron generadas a partir de  $2 \times 10^5$  simulaciones.

### 3.2.2 Simulación del muestreo y aplicación de los diferentes métodos

Los primeros métodos que evaluamos fueron los diferentes promedios de la frecuencia de mutantes cuyo uso está más extendido en la literatura. Estos son, por orden descendente de uso: la media aritmética, la mediana, la media geométrica y la práctica heterogénea de descartar valores extremos. En este último caso, ya que no existe un criterio unificado para definir qué se considera extremo (muchos autores ni tan siquiera comentan nada al respecto), hemos optado por eliminar siempre el mayor de los valores, aplicándose la media aritmética al conjunto restante. También exploramos otros tres métodos que consideramos tanto robustos frente a la asimetría de la distribución como triviales en cuanto a su uso. Éstos son la media armónica, el primer cuartil y el valor mínimo, que consiste simplemente en descartar todos los valores



excepto el que arroje el menor conteo de mutantes.

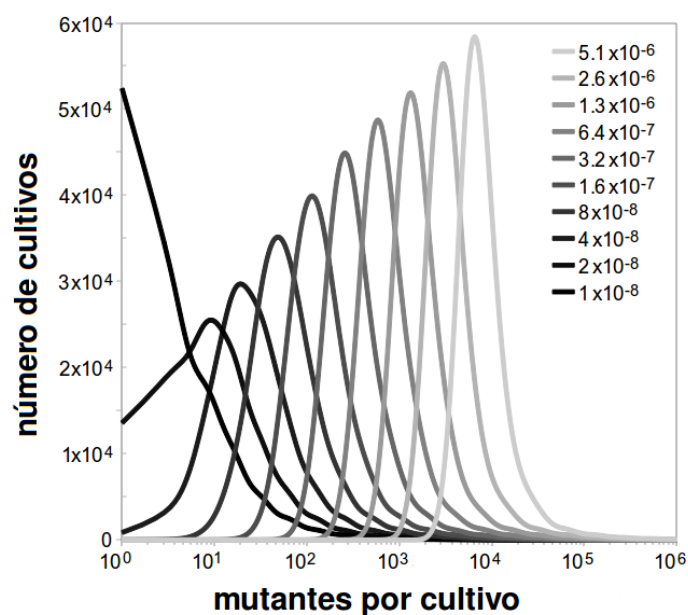
En cuanto a los análisis de fluctuación, hemos incluido en el estudio los dos estimadores más usados: el de la mediana de Jones (Jones y cols. 1994) y el MSS (Sarkar y cols. 1992). El primero se implementó según la fórmula número seis del artículo original y el segundo siguiendo el algoritmo descrito en Foster (Foster 2006). Otros dos métodos clásicos como son la mediana de Lea y Coulson (Lea y Coulson 1949) y la fórmula de Drake (Drake 1991) fueron excluidos porque se ha demostrado que la mediana de Jones se comporta tan bien o mejor que ellos, es capaz de acomodar información relativa a la eficiencia de la siembra y resulta más fácil de utilizar ya que posee una fórmula explícita. El método original de Luria y Delbrück, conocido como el del  $p_0$  (Luria y Delbrück 1943), fue también excluido ya que, puesto extrae información únicamente de la frecuencia de cultivos sin mutantes, su rango de aplicabilidad se halla muy limitado en circunstancias con bajo número de réplicas.

Los experimentos hechos con las tasas de mutación mas bajas, en ocasiones, generan conteos de mutantes iguales a cero. Esto no representa un problema para la mayoría de los métodos aquí evaluados, excepto para el del valor mínimo y las medias armónica y geométrica. El motivo es que la aplicación de estos métodos está condicionada a que ningún valor sea igual a cero. Para que esto sea un problema con la mediana, la mediana de Jones, el primer cuartil y el descarte de valores extremos (sólo en el caso con tres réplicas), la proporción de cultivos vacíos tiene que ser mayor que la mitad, circunstancia bastante más infrecuente. Por último, para que la media aritmética y el método MSS sean inaplicables, todos los cultivos tienen que salir vacíos. Para evaluar la incidencia de estas situaciones, se ha registrado el número de veces que cada método ha resultado inaplicable.

Partiendo de las distribuciones descritas en el apartado anterior, el siguiente paso consistió en la aplicación de cada método a una muestra de esas distribuciones. El tamaño de muestra ( $C$ ) se refiere al número de cultivos empleados en la estimación de la tasa de mutación. Los valores de frecuencia de mutantes que se aparecen publicados en la literatura generalmente lo hacen partiendo de  $C=3$ , aunque también es frecuente el caso  $C=4$ . Los análisis presentados en este trabajo se han centrado en tamaños de muestra en el rango de uno a cuatro. Vale la pena hacer notar que el uso de algunos métodos carece de sentido para tamaños de muestra menores de tres, como por ejemplo es el caso de la mediana, que es exactamente igual a la media en experimentos con sólo uno o dos elementos. Los resultados aquí mostrados han sido generados a partir de 5000 valores para cada combinación de método, tamaño de muestra y tasa de mutación.

### 3.2.1 Análisis de precisión y repetibilidad

Aparte del rango de aplicabilidad, discutido en el apartado anterior, cada uno de los métodos aquí presentados ha sido evaluado en cuanto a precisión y repetibilidad. La precisión se refiere a la cercanía que presentan las estimaciones al valor real (Gupta 2005) mientras que la repetibilidad hace referencia a la tendencia de estimaciones consecutivas a generar resultados similares bajo las mismas condiciones (Gupta 2005). Los valores de precisión y repetibilidad aquí mostrados se han calculado registrando cuantas de las 5000 estimaciones llevadas a cabo para cada combinación de método, tasa de mutación y número de réplicas han caído en un intervalo de un tamaño definido. En el caso de la precisión, el intervalo comprendía del doble a la mitad del valor exacto de la tasa de mutación empleada para generar la distribución de mutantes por cultivo correspondiente. En el caso de la reproducibilidad, se estimó la probabilidad de que una estimación determinada cayera en un intervalo definido por el doble y la mitad del valor de otra estimación extraída en las mismas condiciones.



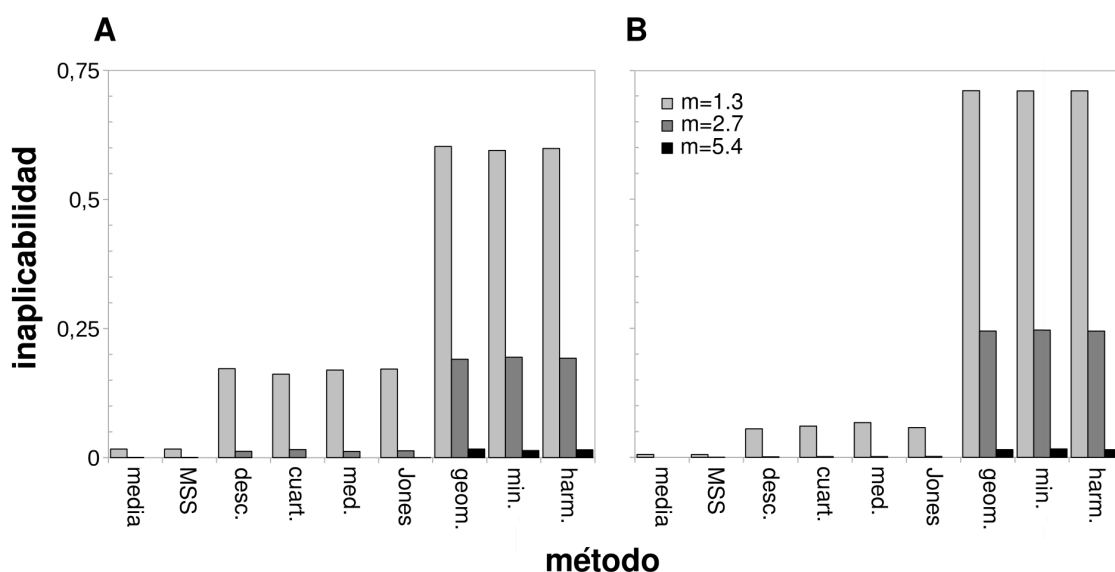
*Figura 3.2.- Las diez distribuciones del número de mutantes por cultivo, obtenidas por simulación, empleadas en este trabajo. Esas distribuciones se usaron para extraer los valores de los experimentos simulados, en los que se varió el número de cultivos de 1 a 4. A partir de estos datos se estimó la tasa de mutación mediante los diferentes métodos aquí explorados. Finalmente, el rendimiento de cada método se analizó en términos de precisión y reproducibilidad.*

Los casos en los que el valor de inaplicabilidad excedieron el 10% (véase figura 3.3) fueron excluido de estos cálculos. Esos valores son precisamente los que faltan en las figuras 3.4 y 3.5.

### 3. 3 Resultados y discusión

En muchas ocasiones, diferentes condicionantes experimentales obligan a estimar la tasa de mutación empleando un bajo número de réplicas. En estas circunstancias, los experimentalistas han optado por usar la frecuencia de mutantes como estimador de la tasa de mutación, bajo la creencia de que los análisis de fluctuación - métodos desarrollados a propósito para tratar con este tipo de datos - carecen aquí de validez estadística. En este trabajo hemos comparado el comportamiento, bajo este tipo de circunstancias, de siete promedios de frecuencia de mutantes (incluyendo los cuatro más comunes en la literatura) y de los dos métodos de fluctuación más relevantes en la actualidad.

Los resultados de aplicabilidad, medida de la sensibilidad frente a la presencia de cultivos vacíos en un experimento (véase figura 3.3), permiten clasificar los nueve métodos aquí evaluados en tres categorías. En primer lugar, los métodos muy sensibles: el valor mínimo, la media geométrica y la media armónica, que resultan virtualmente imprácticos para el valor más pequeño de mutantes por cultivo estudiado en este trabajo ( $m=1.3$ ), y bastante problemáticos con el segundo menor ( $m=2.7$ ). Es curioso que estos métodos presenten menor aplicabilidad con cuatro réplicas que con tres. Esto es consecuencia de que un número mayor de réplicas incrementa la probabilidad de encontrar al menos un cultivo vacío, circunstancia que impide el uso de cualquiera de ellos, como ya se discutió en el apartado 3.2.2. El segundo grupo estaría comprendido por la mediana, el primer cuartil, la mediana de Jones y el método de descarte del valor extremo. Estos métodos sólo presentan problemas con el valor más pequeño de los evaluados aquí; los cuales, en contraste con el grupo anterior, desaparecen aumentando el número de réplicas. Esto es debido a que para que estos métodos sean inaplicables, la proporción de cultivos vacíos debe exceder la mitad del total, lo que se hace infrecuente a medida que más réplicas son utilizadas. El último grupo consiste en la media aritmética y en el valor más probable de MSS, ambos muy poco sensibles a la presencia de cultivos vacíos, ya que su condición de inaplicabilidad es mucho más restrictiva: no debe aparecer ningún mutante en ninguno de los cultivos. Al igual que el grupo anterior, la inaplicabilidad disminuye con el número de réplicas.



*Figura 3.3.- Probabilidad de que los diferentes estimadores aquí evaluados sean inaplicables, para dos diferentes valores del número de réplicas (C). Cuando el número de mutaciones por cultivo (m) es bajo, la aparición de un cultivo sin mutantes se vuelve bastante probable. En tales circunstancias, algunos de los métodos no pueden aplicarse. Los más sensibles son aquellos en los que un único cultivo vacío es suficiente para impedir su uso (el valor mínimo, la media geométrica y la media harmónica). En el otro extremo, el método del valor más probable de MSS es el más robusto, ya que requiere que todos los cultivos estén vacíos para no poder ser aplicable.*

En cuanto a precisión, la figura 3.4 confirma la expectativa de que la frecuencia de mutantes exhibe una pobre correlación con la tasa de mutación. Además, resulta llamativo que la precisión disminuya levemente con el número de réplicas, hecho que se explica por la mayor probabilidad de aparición de cultivos con valores extremos (nótese que esto afecta también al método de descarte del valor extremo, ya que éste sólo elimina el mayor valor del conjunto de datos). Por su parte, los análisis de fluctuación mantienen una precisión bastante aceptable en la mayor parte del rango de valores de  $m$ , a pesar del bajo número de réplicas. El comportamiento de estos métodos en estas circunstancias era desconocido, ya que los estudios previos habían considerado exclusivamente números mayores (Stewart 1994). Este resultado demuestra que tanto la mediana de Jones como el valor más probable de MSS pueden ser usados para estimar tasas de mutación en este rango de número de réplicas, donde tradicionalmente su uso había sido vetado.

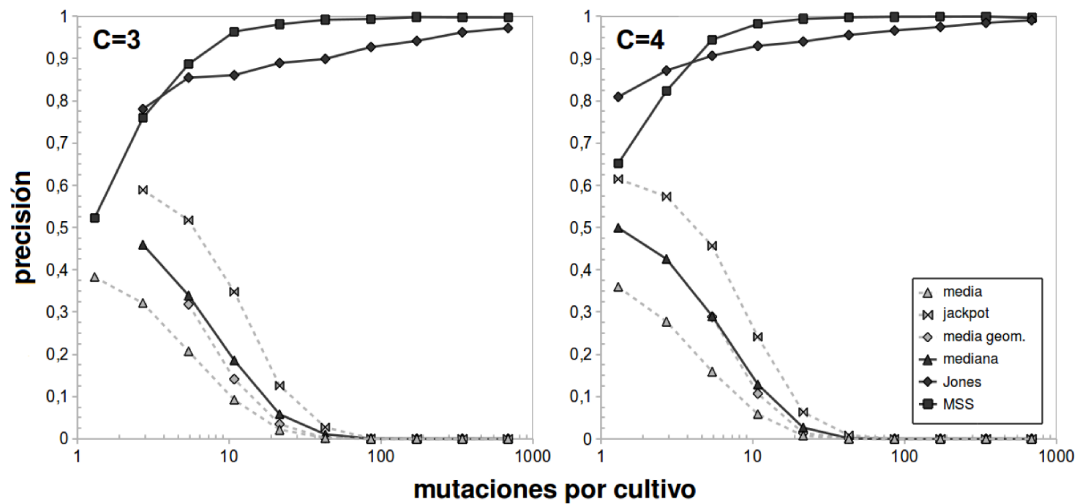


Figura 3.4.- Precisión de algunos de los métodos evaluados en este trabajo, para dos diferentes valores del número de réplicas (C). Como era esperado, cualquier promedio de la frecuencia de mutantes se comporta pobremente, en especial la media aritmética. En contraste, los métodos de fluctuación presentan una precisión bastante aceptable, sobre todo para valores de  $m > 10$ .

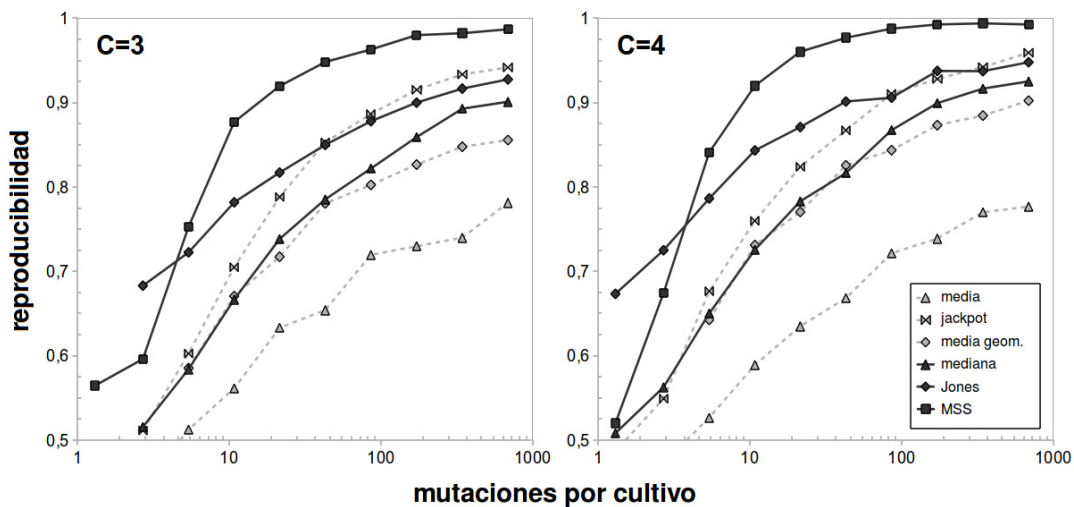


Figura 3.5.- Reproducibilidad de algunos de los métodos aquí evaluados, para dos diferentes valores del número de réplicas (C). En ambos casos el método del valor más probable de MSS ofrece los mejores resultados, excepto para valores muy pequeños de  $m$ , donde es aventajado por el método de la mediana de Jones. Sin embargo, como se muestra en la figura 3.3, es esos casos la mediana de Jones exhibe una mayor inaplicabilidad.

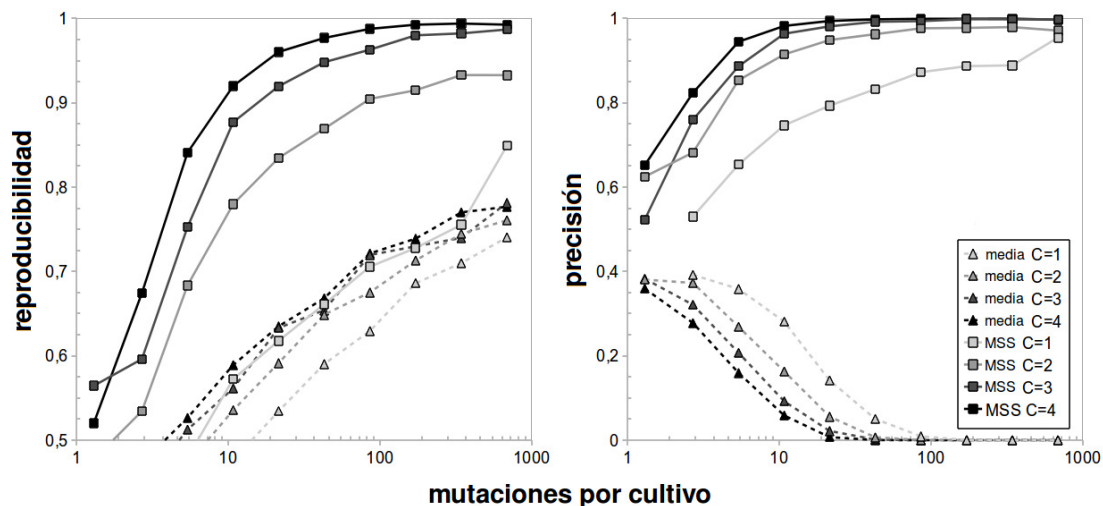
Además, como muestra la figura 3.5, los diferentes promedios de frecuencia de mutantes presentan una reproducibilidad menor que los dos análisis de fluctuación. La

baja reproducibilidad es especialmente acusada en el caso de la media aritmética, precisamente el promedio más usado en la literatura. Aunque existe la creencia de que las frecuencias de mutantes, si bien poco precisas, pueden ser utilizadas para hacer comparaciones entre diferentes condiciones experimentales; estos resultados indican que su uso tampoco es recomendable en estos casos.

Los resultados obtenidos con la media armónica, el primer cuartil y el valor mínimo, explorados aquí únicamente como alternativas triviales a los promedios de frecuencia de mutantes, fueron bastante satisfactorios. Sin embargo, aunque su comportamiento supone una mejora respecto a la media aritmética, y en ocasiones superior incluso a la ofrecida por la mediana o el descarte de valores extremos, éste sigue siendo inferior al exhibido por los métodos de fluctuación, por lo que no merecerán aquí mayor consideración.

La principal conclusión que se extrae de este estudio es que el uso de los promedios de frecuencia de mutantes carece de justificación alguna a la hora de informar valores de mutagénesis, siendo en su lugar más apropiado el uso de los métodos de fluctuación. De los dos métodos evaluados aquí, el estimador del valor más probable de MSS presenta un mejor comportamiento en términos tanto de precisión como de reproducibilidad; excepto para valores de  $m < 5.4$ , un rango estrecho donde además la mediana de Jones exhibe algunos problemas de aplicabilidad. Esta ventaja mostrada por el valor más probable de MSS puede adscribirse al hecho de ésta utiliza toda la información presente en un experimento, mientras que la mediana de Jones descarta todos los valores salvo aquellos estrictamente necesarios para computar la mediana de la distribución observada.

En términos globales, el método del valor más probable de MSS es el más aplicable, preciso y reproducible de cuantos métodos han sido aquí evaluados. Para apreciar más claramente la mejora que el uso de este método supone respecto al de la media aritmética, el método más común con diferencia, la figura 3.6 presenta los resultados de precisión y reproducibilidad obtenidos para ambos métodos con diferente número de réplicas. El valor más probable de MSS emplea más eficientemente la misma cantidad de información que la media aritmética, como demuestra el hecho de que su uso en experimentos con sólo una réplica produce resultados más precisos y con aproximadamente la misma reproducibilidad que los producidos por la media aritmética con cuatro réplicas. En este sentido, vale la pena recordar cómo Lea y Coulson ya advertían en 1949 que la varianza del promedio de mutantes en varios cultivos no es menor que la misma varianza en un cultivo individual, por lo que no se espera ninguna mejora en precisión con el aumento del número de réplicas.



*Figura 3.6.- Comparación entre la media aritmética y el método del valor más probable de MSS, en términos de precisión y repetibilidad, para diferentes valores del número de réplicas (C). La media aritmética es el promedio más utilizado a la hora de medir frecuencia de mutantes, mientras que el método del valor más probable de MSS se ha revelado como el estimador más eficiente de cuantos aquí se han analizado. Nótese que la aplicación de este método a un experimento con una sola réplica ofrece aproximadamente la misma reproducibilidad que emplear la media aritmética con cuatro.*

El uso del valor más probable de MSS presenta además otras ventajas únicas. Stewart (Stewart 1994) demostró que el logaritmo natural de los valores que este método genera se distribuyen siguiendo una distribución normal, por lo que se facilita enormemente cualquier análisis estadístico que se quiera hacer con los resultados: los intervalos de confianza pueden ser fácilmente calculados (Stewart 1994) y las comparaciones pueden llevarse a cabo con métodos paramétricos como la t de Student o el ANOVA (Rosche y Foster 2000). A pesar de haber sido propuesto a principios de la década de los noventa, el uso del valor más probable de MSS ha tardado en gozar de popularidad debido a que su implementación requiere conocimientos de programación. En la última década se han publicado varios programas que ahorran al experimentalista esta tarea (Hall y cols. 2009; Lang y Murray 2008; Zheng 2002) entre los cuales destacamos el trabajo de Hall y cols. (Hall y cols. 2009) que proporciona una herramienta disponible en Internet que permite hacer los cálculos mediante una interfaz muy sencilla. Por consiguiente, su mayor eficiencia y a su facilidad de uso nos llevan a recomendar el uso de este método en cualquier experimento que tenga como objeto la estimación de tasas de mutación.

<b>Precisión</b>					
<b><i>m</i></b>	<b>media</b>	<b>MSS</b>	<b>mínimo</b>	<b>media harm.</b>	<b>1<sup>er</sup> cuartil</b>
1.3	0.36	0.65	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	0.58
2.7	0.28	0.82	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	0.64
5.4	0.16	0.94	0.73	0.50	0.55
10.8	0.06	0.98	0.71	0.24	0.32
21.5	0.01	0.99	0.46	0.05	0.11
43	0	1	0.19	0	0.01
86	0	1	0.03	0	0
172.1	0	1	0	0	0
344.1	0	1	0	0	0
688.2	0	1	0	0	0

<b>Reproducibilidad</b>					
<b><i>m</i></b>	<b>media</b>	<b>MSS</b>	<b>mínimo</b>	<b>media harm.</b>	<b>1<sup>er</sup> cuartil</b>
1.3	0.41	0.52	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	0.47
2.7	0.47	0.67	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	0.54
5.4	0.53	0.84	0.60	0.64	0.66
10.8	0.59	0.92	0.72	0.78	0.77
21.5	0.63	0.96	0.83	0.87	0.85
43	0.67	0.98	0.91	0.92	0.89
86	0.72	0.99	0.95	0.94	0.92
172.1	0.74	0.99	0.97	0.96	0.95
344.1	0.77	0.99	0.99	0.97	0.96
688.2	0.78	0.99	0.99	0.98	0.97

*Tabla 3.1.- Resultados obtenidos con los estimadores alternativos estudiados en este trabajo, en el caso C=4. Aparte de los métodos basados en el promedio de la frecuencia de mutantes habituales en la literatura, se procedió a la evaluación de otros métodos de implementación también trivial. La media aritmética y el método del valor más probable de MSS se incluyen en la tabla con propósito de referencia. Sólo el método del primer cuartil presentó un rendimiento aceptable, aunque insuficiente para competir con el método de MSS. m: mutaciones por cultivo. n.a.: casos en los que el valor de inaplicabilidad (mostrado en la figura 3.3) excedió el 10%.*

Por último, quisiéramos refrendar la recomendación hecha originalmente por Stewart de crecer los cultivos lo máximo posible (Stewart 1994), ya que tanto precisión como reproducibilidad mejoran con el incremento de *m* (en el caso del valor más probable de MSS, por ejemplo, valores de *m*~10 suponen estimaciones con valores de precisión y reproducibilidad por encima del 90%, un valor aceptable para muchos propósitos). Además, esta práctica tenderá a igualar el tamaño poblacional final de las diferentes



réplicas, reduciendo así una variabilidad cuyo impacto en la estimación de las tasas de mutación es hoy día desconocido (Foster 2006). El incremento en el tamaño poblacional también reduce el efecto del retraso fenotípico, aunque en contrapartida aumenta el de la selección. Estudios futuros deberán evaluar el impacto de estas y otras desviaciones del modelo de Lea y Coulson en los análisis de fluctuación llevados a cabo con bajo número de réplicas.

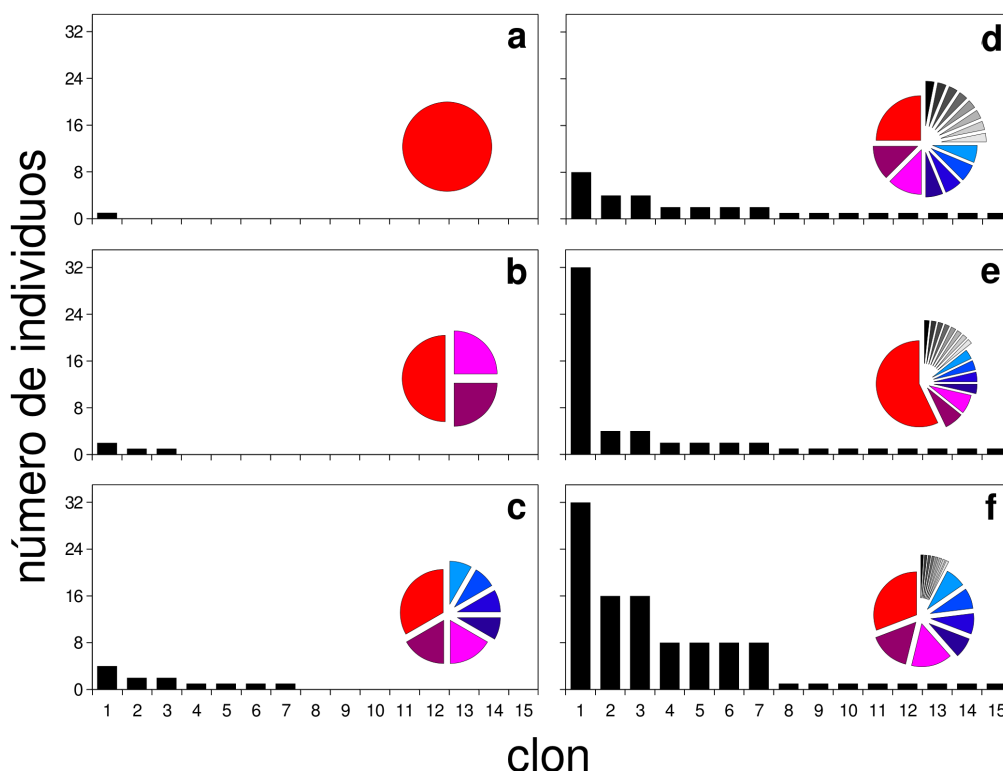


## **4 La expansión clonal y la diversidad genética de una población asexual.**

### **4. 1 Introducción**

Uno de los conceptos básicos de la teoría evolutiva es que la diversidad genética de una población determina su habilidad para responder a presiones selectivas (Fisher 1930). Es por tanto lógico que los determinantes de la diversidad genética hayan recibido un gran interés en el contexto de áreas tan diversas como la biología evolutiva, la biología de la conservación o la mejora genética agropecuaria. Clásicamente se ha reconocido que la diversidad, de la índole que sea, no sólo es función del número sino también de la abundancia relativa de las diferentes clases de elementos. Dicho concepto fue introducido originalmente en el debate ecológico por el estadístico británico Edward Simpson (Simpson 1949). En su artículo seminal, Simpson se preguntaba si una población formada por cinco especies con la misma abundancia debería ser considerada igual de diversa que una población con las mismas cinco especies, pero donde una de ella representase el 95% de los individuos. La probabilidad de coger dos individuos al azar de la misma especie, una forma intuitiva de entender la diversidad, es claramente superior en el segundo de los casos. Esta es la base de la distinción entre riqueza y equitatividad, las dos dimensiones tradicionalmente consideradas de la diversidad. Para un número dado de clases, la máxima diversidad se corresponde con la disposición de máxima equitatividad; que es aquella donde todas las clases presentan el mismo número de elementos (Pielou 1966).

De los múltiples factores que los libros de texto típicamente recogen como determinantes de la diversidad genética, destaca de forma especial la importancia del tamaño poblacional. Ciertamente, manteniendo constantes factores como la tasa de mutación o la tasa de emigración, las poblaciones más grandes serán más diversas que las pequeñas debido a dos razones: i) el mayor suministro de nueva variabilidad genética por mutación y ii) la menor influencia de la deriva genética. Sin embargo, un mayor tamaño poblacional también implica que los mutantes tempranos disponen de más tiempo para expandirse. Este fenómeno, reconocido por Salvador Luria y Max Delbrück hace más de medio siglo (Luria y Delbrück 1943), provoca que la abundancia relativa de los clones de una población asexual sea muy poco equitativa. Ello es debido



*Figura 4.1.- Ejemplos de la distribución del tamaño clonal en una población asexual. Los gráficos de pastel ilustran visualmente la diversidad de cada caso, que puede entenderse intuitivamente como la probabilidad de muestrear al azar dos individuos del mismo clon. Los paneles a-d muestran tres generaciones consecutivas de una población ideal donde la mutación se produce de forma estrictamente determinista y proporcional al tamaño poblacional. El clon número 1 aparecido en la primera generación (a) alcanza un tamaño de 8 individuos en la cuarta generación (d). Esta expansión clonal provoca que la distribución del número de individuos por clon se haga cada vez más desigual. Este efecto se exagera si se permite que la mutación pueda producirse estocásticamente (e). En este caso, la ocurrencia de la primera mutación en una generación muy temprana genera un clon que domina la población final. La desigualdad también se exagera si la tasa de expansión de los clones es mayor que la de las células no mutantes (f) (en este ejemplo, los mutantes cuadriplican la tasa de crecimiento del no mutante).*

a que los clones emergen en diferentes generaciones a lo largo del crecimiento de la población, y cuanto más temprano aparezca un clon mayor será su tamaño final. Un aumento en el tamaño poblacional se traducirá entonces en que los mutantes tempranos se expandan durante mayor número de generaciones, exacerbándose así diferencia de tamaño entre los clones más grandes y más pequeños. En consecuencia,

aunque las poblaciones más grandes exhibirán una mayor riqueza, ésta irá también unida a una menor equitatividad (ver figura 4.1).

La cuestión que motiva este trabajo es hasta qué punto la expansión clonal puede contrarrestar el incremento en diversidad genética asociado al mayor suministro mutacional de poblaciones más grandes. Para analizar esta cuestión hemos desarrollado un modelo matemático que permite el estudio del cambio en la diversidad genética como producto de ambos procesos. La predicción fundamental del mismo es que la expansión clonal es sólo capaz de reducir la diversidad bajo ciertas circunstancias, concretamente, cuando la aptitud de los mutantes es mayor que la del tipo salvaje. En tales circunstancias la correlación entre la diversidad y el tamaño poblacional se pierde rápidamente, lo que significa que no importa cuán grande se haga una población, la diversidad permanecerá constantemente baja. Estas predicciones fueron confirmadas mediante simulaciones por ordenador y mediante el uso de poblaciones experimentales de la bacteria *P. aeruginosa*.

## 4. 2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Modelo matemático

En este trabajo presentamos un modelo de crecimiento de una población asexual, donde cada individuo presenta un único *locus* con múltiples alelos. Por simplicidad, la mutación es tratada de forma determinista, todos los alelos confieren el mismo valor adaptativo y el tiempo de generación transcurre de forma discreta y síncrona. El proceso comienza en el tiempo  $t=0$  cuando una poblaciones compuesta en exclusiva por no mutantes alcanza un tamaño de exactamente  $N_0=1/\mu$ , donde  $\mu$  denota la tasa de mutación por generación con la que se generan nuevos individuos mutantes. Ya que  $N_0\mu=1$ , el primer mutante, y por tanto el primer clon, es originado precisamente cuando  $t=0$ . Esta generación es conocida en la literatura como la generación de Luria-Delbrück ( $t_{LD}$ ). A cada generación la población no mutante duplica su tamaño produciendo exactamente  $N_t\mu=2^tN_0\mu=2^t$  nuevos clones, mientras que los clones preexistentes multiplican su tamaño por un factor  $r$  (ver figura 4.2).

De acuerdo con estas asunciones, la distribución de mutantes entre clones seguirá una secuencia geométrica, es decir, el clon aparecido en la 1ª generación será  $r$  veces más abundante que los aparecidos en la 2ª, y éstos a su vez serán  $r$  veces más abundantes que los aparecidos en la 3ª, y en general los clones aparecidos en la generación  $t$  serán  $r^{t'-t}$  veces más abundantes que los de la generación  $t'$ . De todo lo

anterior puede deducirse que el número de mutantes ( $m_t$ ) en la generación  $t$ -ésima puede escribirse como:

$$m_t = \sum_{i=0}^t 2^i r^{t-i} = r^t \sum_{i=0}^t (2/r)^i \quad (1.1)$$

Esta expresión puede ser simplificada utilizando la fórmula de la serie geométrica, tal que:

$$m_t = r^t \sum_{i=0}^t (2/r)^i = r^t \frac{1 - (2/r)^{t+1}}{1 - 2/r} = \frac{r^{t+1} - 2^{t+1}}{r - 2} \quad \text{cuando } r \neq 2 \quad (1.2)$$

y

$$m_t = 2^t \sum_{i=0}^t 1^i = 2^t (t+1) \quad \text{cuando } r=2 \quad (1.3)$$

Para estudiar el cambio en la diversidad genética en este modelo, usaremos como indicador la probabilidad  $P_t$  de tomar, sin reposición, dos mutantes del mismo clon. Esta probabilidad se conoce habitualmente en la literatura ecológica como el índice de Simpson. Cuando  $t=0$  esta probabilidad no está definida, ya que sólo hay un único mutante en la población. Cuando  $t=1$ , sin embargo, puede calcularse siguiendo la regla elemental de Laplace, tal que:

$$P_1 = \frac{r}{m_1} \frac{(r-1)}{(m_1-1)} \quad (2)$$

No simplificaremos esta expresión puesto que su forma actual será de utilidad para inferir la expresión general. Para la segunda generación, podemos escribir la probabilidad como:

$$P_2 = \frac{r^2}{m_2} \frac{(r^2-1)}{(m_2-1)} + 2 \frac{r}{(m_2)} \frac{(r-1)}{(m_2-1)} \quad (3)$$

Y de forma similar, para la tercera generación:

$$P_3 = \frac{r^3}{m_3} \frac{(r^3-1)}{(m_3-1)} + 2 \frac{r^2}{(m_3)} \frac{(r^2-1)}{(m_3-1)} + 4 \frac{r}{(m_3)} \frac{(r-1)}{(m_3-1)} \quad (4)$$

Del análisis de las expresiones anteriores podemos inferir una fórmula general que nos permita estudiar hasta qué punto la expansión clonal es capaz de reducir la diversidad a medida que una población aumenta de tamaño. Esta fórmula es:

$$P_t = \frac{\sum_{i=0}^{t-1} 2^i r^{t-i} (r^{t-i} - 1)}{m_t (m_t - 1)} \quad (5)$$

## 4.2.2 Modelo computacional

Este modelo es una ampliación del ya presentado en el capítulo anterior, donde una población celular crece por división binaria, y cada división tiene asociada una probabilidad de resultar en la aparición de un nuevo mutante. Las principales diferencias con aquel radican en que, por un lado, se ha implementado que los mutantes puedan presentar tasas de crecimiento diferentes a las del tipo salvaje; y por otro, a que se mantiene un registro de a cual clon pertenece cada mutante, cosa innecesaria en el programa original. La tasa de mutación se fijó en  $1.19 \times 10^{-7}$ , valor muy próximo a la tasa de mutación estimada experimentalmente para la resistencia a fosfomicina en nuestras condiciones (ver apartado siguiente). Esta tasa de mutación se traduce en que la generación de Luria-Delbrück se corresponda con 23 generaciones de división binaria, partiendo de una única célula ( $t_{LD} = \log_2 1 / \mu$ ). Tras el crecimiento de la población y la consiguiente acumulación de mutantes, un segundo programa simula el muestreo al azar, sin reposición, y la comparación de dos mutantes de cada experimento. Toda la programación se llevó a cabo utilizando el lenguaje R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

## 4.2.3 Métodos experimentales

Todos los experimentos aquí realizados se llevaron a cabo con la cepa PA14 de *P. aeruginosa*, obtenida de (Bjedov y cols. 2003). Partiendo de un cultivo nocturno del tipo salvaje, se inocularon  $\sim 10^3$  células por experimento en matraces Erlenmayer (50 ml) con 10 ml de medio LB, tras lo cual se procedió a la incubación a 37° con fuerte agitación. Los tiempos de incubación, variables entre regímenes, fueron optimizados previamente para obtener poblaciones de  $\sim 10^7$  células en el caso de los regímenes *ØS* y *FS*, y  $\sim 10^{11}$  en los regímenes *ØB* y *FB*. Estos tiempos de incubación fueron, respectivamente, 6 h para el régimen *ØS*, 16 h para *ØB*, 9.5 h para *FS* y 17 h para *FB*.

Tras la incubación se procedió a la siembra en placas de LB agar para estimar viables, y en placas de LB agar con concentraciones letales de fosfomicina (128 mg/L) para seleccionar mutantes con pérdida de la función del transportador GlpT. En condiciones estándar de laboratorio esta pérdida no tiene efecto sobre la aptitud (Castañeda-García y cols. 2009), y por lo tanto la tasa de crecimiento de los diferentes mutantes de resistencia es indistinguible de la del tipo salvaje. Por el contrario, en presencia de 8 mg/L de fosfomicina (la mitad de la CMI del tipo salvaje, estimada mediante el método de microdilución) estos mutantes exhiben una tasa de crecimiento ~2.8 veces mayor que el tipo salvaje (tiempos de duplicación de ~29 y ~82 min, respectivamente), la cual se estimó por triplicado como la pendiente máxima del logaritmo de la densidad óptica respecto al tiempo (Couce y cols. 2012) (ver figura 4.3).

La frecuencia de mutantes observados se utilizó para la estimación, mediante el método del valor más probable de MSS (Sarkar y cols. 1992) de la tasa de mutación de la resistencia a fosfomicina ( $\mu_{\text{MSS}}=1.14 \times 10^{-7}$ ). Con el objeto de caracterizar la base genética de las mutaciones de resistencia, se seleccionaron dos colonias de cada experimento por proximidad a sendos puntos arbitrarios, y se amplificó y secuenció su gen *glpT*. Amplificación y secuenciación se realizaron con los oligonucleótidos: 5'-ACGAAGGCGGCGAGTATTGC-3' y 5'-CCTGTCTGAGCCTGCATGTGTATG-3'.

G	distribución clonal	mutantes	clones
$t_{ld}$	1	1	1
	↓		
$t_{ld+1}$	$r \quad 1 \quad 1$	$r+2$	3
	↓ ↓ ↓		
$t_{ld+2}$	$r^2 \quad r \quad r \quad 1 \quad 1 \quad 1 \quad 1$	$r^2+2r+4$	7
	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓		
$t_{ld+3}$	$r^3 \quad r^2 \quad r^2 \quad r \quad r \quad r \quad r \quad 1 \quad 1 \quad 1 \quad 1 \quad 1 \quad 1 \quad 1 \quad 1$	$r^3+2r^2+4r+8$	15
	⋮ ⋮	⋮	⋮
$t_{ld+t}$	$c(r^n)=2^{t-n}$	$M = \sum_{i=1}^t 2^{i-1} r^{t-i}$	$m = \sum_{i=1}^t 2^i - 1$

*Figura 4.2.- Modelo de la acumulación de mutantes en una población asexual. Por simplicidad, la mutación es tratada de forma determinista y estrictamente proporcional al tamaño de población. El proceso comienza cuando el tamaño de la población no mutante es tal que se produce la primera mutación. En el diagrama sólo muestra la acumulación de mutantes, y no la de la subpoblación no mutante, mucho mayor.*



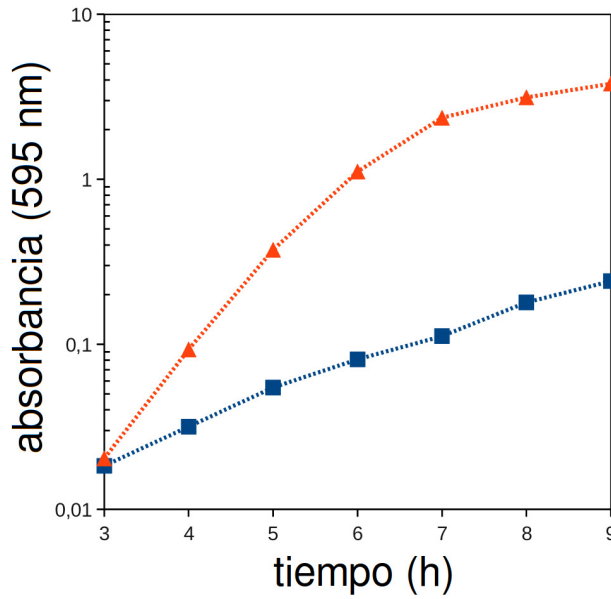


Figura 4.3.- Curvas de crecimiento del tipo salvaje (azul) y un mutante  $glpT^-$  (rojo) de *P. aeruginosa*, a concentraciones subinhibitorias de fosfomicina. En estas condiciones la tasa de crecimiento del mutante se estimó  $\sim 2.8$  veces mayor que el tipo salvaje.

### 4. 3 Resultados y discusión

Para comprender cómo la diversidad genética depende de la intensidad de la expansión clonal, hemos desarrollado un modelo matemático que computa la probabilidad de muestrear dos mutantes independientes en función del número de generaciones, cuya fórmula general se presenta en la expresión (5). Un análisis visual de esta expresión revela *grosso modo* la total dependencia de la susodicha probabilidad respecto a la expansión clonal, ya que cuando  $r \rightarrow \infty$ ,  $P_t \rightarrow 1$ , y cuando  $r \rightarrow 1$  entonces  $P_t \rightarrow 0$ . Sin embargo, la representación gráfica de esta expresión (ver figura 4.4) sugiere que la relación entre  $r$  y  $P_t$  no es trivial. Para entender la dependencia de  $P_t$  respecto al tamaño poblacional y a  $r$ , analizamos el comportamiento de la expresión (5) cuando  $t \rightarrow \infty$ . En lo que sigue, discutiremos la soluciones al modelo para los casos  $r > 2$ ,  $r = 2$  y  $r < 2$ .

Cuando  $r > 2$ , la expresión (5) estará dominada por el mayor de los términos exponenciales de su numerador. Este término es el primero, y puede demostrarse que:

$$P_t = \frac{r^t(r^t - 1)}{r^t \sum_{i=0}^t (2/r)^i (r^t \sum_{i=0}^t (2/r)^i - 1)} \approx A^2 \quad (6)$$

A puede ser simplificado dejando una serie geométrica en el denominador. Ya que  $r > 2$  esta serie converge cuando  $t \rightarrow \infty$  a un valor S que puede ser calculado utilizando la fórmula de la serie geométrica. Substituyendo S, A puede escribirse como:

$$A = \frac{r^t}{r^t \sum_{i=0}^t (2/r)^i} = \frac{1}{\sum_{i=0}^t (2/r)^i} = 1 - 2/r \quad (7)$$

Y por tanto P puede aproximarse como:

$$P_{\infty} = (1 - 2/r)^2 \quad (8)$$

Cuando  $r=2$ , la expresión (6) puede escribirse, reparando en la expresión (1.3), como:

$$P_t = \frac{\sum_{i=0}^{t-1} 2^i 2^{t-i} (2^{t-i} - 1)}{m_t (m_t - 1)} = \frac{2^{2t} \sum_{i=0}^{t-1} (1/2)^i - 2^t t}{2^t (t+1) (2^t (t+1) - 1)} = \frac{2^{2t+1} - 2^t t}{2^{2t} (t+1)^2 - 2^t (t+1)} \quad (9)$$

Y por tanto se demuestra fácilmente que:

$$P_{\infty} = \frac{2 - t/2^t}{(t+1)^2 - (t+1)/2^t} \rightarrow \frac{2}{(t+1)^2} \rightarrow 0 \quad (10)$$

El caso  $r < 2$  no es tan fácil de resolver como los dos anteriores, y requiere un tratamiento algo más extenso, que será abordado en un trabajo posterior. A instancias de nuestros intereses, y atendiendo a la representación gráfica mostrada en la figura 4.4, parece bastante razonable asumir que  $r \leq 2 \rightarrow 0$ .

Estos resultados se prestan a una interpretación bastante intuitiva. Como se discutió en la introducción, el efecto del tamaño poblacional sobre la diversidad clonal viene controlado por dos fuerzas contrapuestas: el suministro mutacional y la expansión clonal. La primera de ellas aumenta la diversidad al incrementar la riqueza de la distribución clonal, mientras que la segunda la reduce al disminuir su equitatividad. La magnitud de la primera escala con potencias de dos, mientras que la magnitud de la segunda lo hace con potencias de  $r$ . Cuando  $r \leq 2$ , el suministro mutacional es más poderoso que la expansión clonal, y por lo tanto la diversidad crece con el tamaño de población (tendiendo a cero a su vez la probabilidad de muestrear dos miembros del mismo clon). Asimismo, con valores de  $r > 2$  la expansión clonal es capaz de contrarrestar la acción de la mutación, conduciendo al equilibrio representado por la

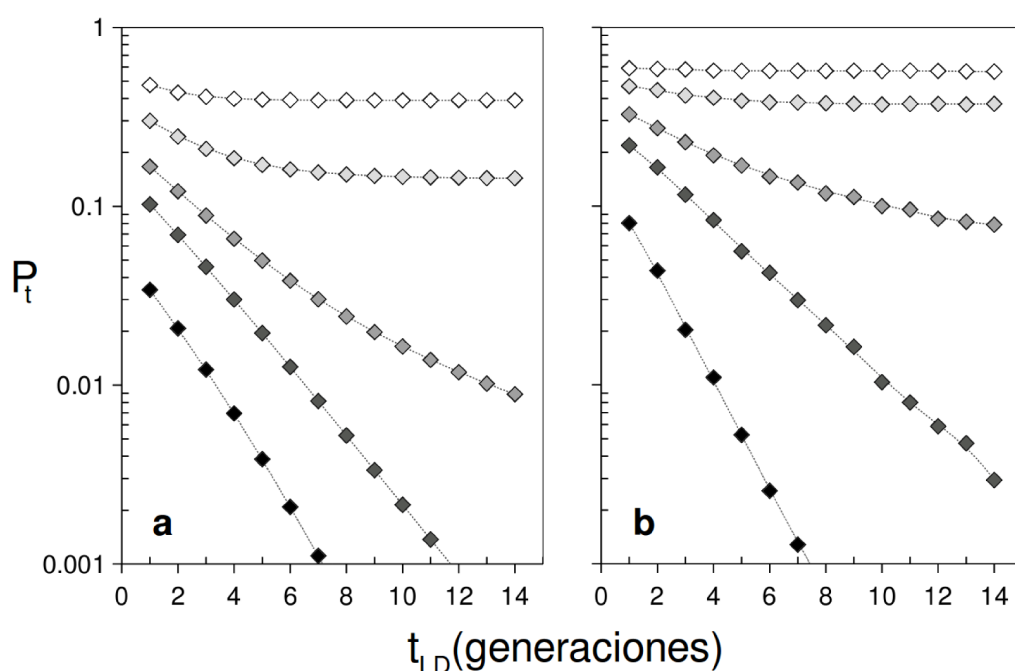
expresión (14).

El análisis del modelo matemático nos ha permitido comprender cómo la diversidad genética depende críticamente de la intensidad de la expansión clonal. Sin embargo, la asunción de que la mutación se produce de forma determinista, si bien conveniente para hacer tratable el análisis, podría estar introduciendo un sesgo artefactual en los resultados. Concretamente, al imponer que la primera mutación sólo pueda producirse en la generación de Luria-Delbrück, el modelo establece un límite superior al tamaño del clon más abundante. De esta forma, se niega el efecto de los infrecuentes pero notorios 'jackpots': cultivos donde la primera mutación se produce tan pronto en el crecimiento del cultivo que el clon resultante representa la inmensa mayoría de la población mutante final. Como consecuencia, el modelo probablemente esté incurriendo en una cierta sobreestimación de la diversidad genética. Para estudiar hasta qué punto esta simplificación afecta a las conclusiones analíticas hemos desarrollado un modelo de simulación por computadora que trata la mutación de forma completamente estocástica.

Los resultados de las simulaciones muestran efectivamente la gran contribución que los 'jackpots' suponen a la reducción de la diversidad genética debida a la expansión clonal (figura 4.4). Este fenómeno es el responsable de que, en comparación con el modelo analítico, la probabilidad de muestrear dos mutantes del mismo clon sea uniformemente mayor a lo largo de las combinaciones de parámetros estudiadas. Por el contrario, el valor umbral que marca el cambio en la dinámica del sistema ( $r \leq 2$ ) no parece verse afectado por la inclusión del efecto de los 'jackpots', y por tanto el comportamiento cualitativo sigue siendo el mismo: la diversidad aumenta con el tamaño poblacional salvo cuando la aptitud del mutante es mayor que la del tipo salvaje, caso en el cual se mantiene en un valor constantemente bajo. Esta invarianza del valor umbral era hasta cierto punto esperada. Cuando  $r=2$ , el modelo analítico ha mostrado que, a cada generación, el incremento en diversidad debido al suministro mutacional supera a su disminución debida a la expansión clonal. La aparición muy temprana de la primera mutación no puede afectar en modo alguno la relación dinámica entre ambas fuerzas contrapuestas, y de ahí que su efecto sobre la diversidad genética sea en exclusiva de índole cuantitativa.

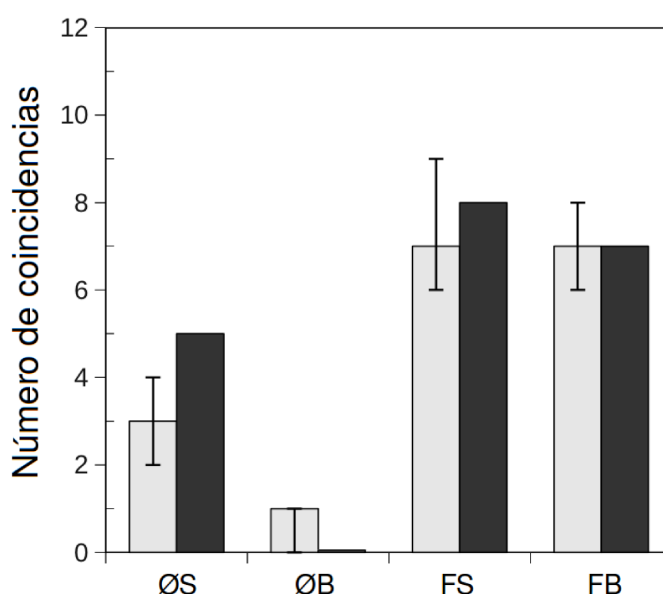
Por último, hemos tratado de comprobar experimentalmente esta independencia de la diversidad genética frente al tamaño poblacional predicha por los resultados teóricos. Para ello hemos estimado la frecuencia con la que en una población bacteriana dos mutantes con el mismo fenotipo pertenecen al mismo clon. Esto se realizó caracterizando mutaciones de resistencia a fosfomicina en poblaciones de la bacteria *P aeruginosa*. La resistencia en este organismo se adquiere prácticamente en exclusiva

mediante la pérdida de función del transportador de membrana GlpT, vía única de entrada del antibiótico (Castañeda-García y cols. 2009). Esta pérdida de función puede ser producida por una gran variedad de alteraciones en la secuencia del gen *glpT*; lo que hace razonable asumir que, dentro de una misma población, dos mutantes que presenten la misma mutación pertenecen al mismo clon. Sin embargo, los experimentos revelaron que la secuencia de *glpT* presenta 'puntos calientes', problemáticos porque aumentan la probabilidad de que dos mutantes independientes exhiban la misma mutación. El caso más llamativo es el del motivo GCCATC, que se repite dos veces consecutivas en la secuencia del tipo salvaje, y cuyas expansiones y contracciones representan casi el 11% (9/83) de las mutaciones independientes que fueron observadas en primera instancia. Otras mutaciones detectadas más de una vez en experimentos independientes son las A916→C y A1006→C, aunque su frecuencia relativa ha sido mucho menor (5/83 y 4/83 respectivamente). El problema causado por estas mutaciones 'ambiguas' se solventó descartando el experimento correspondiente, y realizando una nueva réplica.



*Figura 4.4.- Probabilidad de muestrear dos mutantes del mismo clon a medida que aumenta el tamaño de población, según el modelo analítico (a) y el modelo computacional (b). Las líneas se corresponden, de arriba a abajo, con los siguientes valores de la tasa de crecimiento del mutante:  $r=5$ ,  $r=3$ ,  $r=2$  (la misma que el tipo salvaje),  $r=1.6$  y  $r=1.2$ .*

Para comparar poblaciones de distinto tamaño y mutantes con diferente efecto en aptitud, el diseño experimental involucró la variación de dos parámetros: el tiempo de incubación y la presencia o ausencia de fosfomicina a concentraciones subinhibitorias. La variación en el tiempo de incubación permitió ajustar el tamaño poblacional ( $\sim 10^7$  vs  $\sim 10^{11}$ ), mientras que la presencia del antibiótico permitió ajustar la aptitud del mutante respecto al tipo salvaje ( $w=1$  vs  $w=2.8$ ). De esta forma, en total, se establecieron cuatro regímenes experimentales a los que nos referiremos como  $\emptyset S$  (sin antibiótico, población pequeña),  $\emptyset B$  (sin antibiótico, población grande),  $FS$  (con fosfomicina, población pequeña) y  $FB$  (con fosfomicina, población grande). Por cada uno de los cuatro regímenes ( $\emptyset S$ ,  $\emptyset B$ ,  $FS$  y  $FB$ ) se realizaron 12 cultivos independientes.



*Figura 4.5.- Número de experimentos, de un total de 12, donde dos mutantes tomados al azar pertenecieron al mismo clon. En gris oscuro, resultados experimentales. En gris claro, resultados del modelo computacional (mediana de 1000 réplicas, las barras indican rango intercuartílico).*

En términos cualitativos, los resultados experimentales se ajustan de forma bastante satisfactoria a las predicciones teóricas (figura 4.5, barras negras): la diversidad aumenta con el tamaño en los regímenes sin antibiótico ( $\emptyset S$  vs  $\emptyset B$ ), y se mantiene invariablemente baja en los regímenes con antibiótico ( $FS$  vs  $FB$ ). Para comprobar si el ajuste es también satisfactorio en términos cuantitativos, se ajustó el modelo de simulación a los parámetros experimentales y se estimó la frecuencia esperada de casos, de cada doce experimentos, donde ambos mutantes pertenecen al mismo clon (figura 4.5, barras blancas).

Exp.	$\emptyset B$		$\emptyset S$	
	A	B	A	B
1	<i>n.a.</i>	$T_{568} + T$	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	$T_{659} \rightarrow C$
2	<i>o.p.</i>	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	$\Delta G_{915}$	$G_{812} \rightarrow A$
3	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	$G_{1088} \rightarrow C$	$G_{1088} \rightarrow C$
4	$G_{134} \rightarrow A$	<i>o.p.</i>	$G_{913} \rightarrow A$	$G_{913} \rightarrow A$
5	$G_{558} \rightarrow A$	<i>o.p.</i>	$A_{1006} \rightarrow C$	$A_{1006} \rightarrow C$
6	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	$G_{109} \rightarrow A$	$G_{1238} + 5$	$G_{1238} + 5$
7	<i>o.p.</i>	$T_{383} + TC$	$G_{295} \rightarrow A$	<i>o.p.</i>
8	$G_{54} + G$	$T_{442} \rightarrow A$	$C_{1086} \rightarrow G$	$C_{1086} \rightarrow G$
9	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	<i>o.p.</i>	$A_{784} + A$	<i>o.p.</i>
10	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	<i>o.p.</i>	<i>o.p.</i>	$A_{838} \rightarrow C$
11	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	<i>o.p.</i>	$A_{838} \rightarrow C$	<i>o.p.</i>
12	<i>o.p.</i>	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	$C_{637} \rightarrow T$	$C_{637} \rightarrow T$

Exp.	$FB$		$FS$	
	A	B	A	B
1	$A_{916} \rightarrow C$	$A_{916} \rightarrow C$	$C_{681} \rightarrow G$	$C_{681} \rightarrow G$
2	$\Delta(G_{586} - G_{1044})$	$\Delta(G_{586} - G_{1044})$	$\Delta C_{491}$	<i>o.p.</i>
3	$A_{916} \rightarrow C$	$A_{916} \rightarrow C$	$A_{631} \rightarrow C$	$A_{631} \rightarrow C$
4	$G_{1271} \rightarrow A$	$G_{1271} \rightarrow A$	<b>u.a.</b>	<b>u.a.</b>
5	$A_{916} \rightarrow C$	$A_{916} \rightarrow C$	$C_{1050} + 111$	$C_{1050} + 111$
6	$A_{916} \rightarrow C$	<i>o.p.</i>	$A_{631} \rightarrow C$	<i>o.p.</i>
7	$A_{1006} \rightarrow C$	$A_{1006} \rightarrow C$	$A_{1006} \rightarrow C$	$\Delta G_{1033}$
8	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	$\Delta(G_{211} - C_{216})$	$\Delta G_{80}$	$\Delta G_{80}$
9	$T_{1237} \rightarrow C$	$A_{1006} \rightarrow C$	$A_{916} \rightarrow C$	$A_{916} \rightarrow C$
10	$\Delta G_{899}$	$\Delta G_{899}$	$T_{479} \rightarrow A$	$T_{479} \rightarrow A$
11	$G_{197} \rightarrow A$	$G_{197} \rightarrow A$	$G_{251} \rightarrow A$	<i>o.p.</i>
12	<i>o.p.</i>	$G_{54} + G$	$G_{1087} \rightarrow A$	$G_{1087} \rightarrow A$

Tabla 4.1.- Espectro mutacional observado en el locus *glpT*, para cada una de las cuatro condiciones experimentales aquí empleadas. Las tabla muestra el resultado de 12 experimentos donde se aislaron dos colonias de la misma población (colonias A y B). En fondo gris, experimentos donde la mutación fue la misma en ambos aislados. *n.a.*: casos donde resultó imposible amplificar *glpT*, lo que se interpretó como resultado de una reordenación cromosómica. *o.p.*: casos en los que sólo un miembro de la pareja presenta una mutación en la parte proximal del gen (para la secuenciación, el gen se dividió en dos partes), asumiéndose que la otra mutación deberá encontrarse en la parte terminal, que en tales casos no se secuenció.

Los resultados experimentales también se ajustaron a las predicciones cuantitativas del modelo de simulación estocástico. La pequeña desviación observada en el caso *FS* podría explicarse bien simplemente como fruto del azar (el 31,2 % de las simulaciones mostraron desviaciones tanto o más extremas que ésta) o bien como consecuencia del error en las estimaciones de la tasa de mutación, el tamaño poblacional o la aptitud de los mutantes en cada régimen.

En términos generales, los resultados aquí mostrados desafían la asunción generalizada de que un aumento en el tamaño de población necesariamente se traduce en un aumento en su diversidad. Para que esto se cumpla, hemos demostrado que los mutantes de un fenotipo concreto deben estar desfavorecidos respecto al tipo salvaje. El hecho de que la aptitud de los mutantes controle la equitatividad de su distribución clonal, y por tanto su diversidad, puede tener profundas implicaciones que deberán ser evaluadas en trabajos venideros. En el contexto ecológico, por ejemplo, se ha demostrado que la equitatividad en la distribución de especies en comunidades bacterianas maximiza la capacidad de las mismas para resistir a perturbaciones (Wittebolle y cols. 2009). Esto se ha interpretado por similitud con el concepto de 'bet-hedging', la estrategia de diversificar la inversión para minimizar el riesgo de pérdida frente a condiciones futuras inciertas. Así, en comunidades dominadas por pocas especies, la resistencia global a las perturbaciones va a ser muy dependiente de la resistencia particular de esas pocas especies dominantes. En el contexto genético, la identidad de los clones dominantes determinará en gran medida las trayectorias evolutivas más accesibles para la población. Recientemente se ha descrito que la acumulación de mutaciones de resistencia a diferentes antibióticos puede estar severamente constreñida por las interacciones epistáticas entre dichas mutaciones (Trindade y cols. 2009). Por tanto, una población dominada por una mutación de resistencia concreta, ya sea por su ventaja en aptitud o por la ocurrencia estocástica de un 'jackpot', tenderá a acumular sólo ciertas mutaciones de resistencia secundarias, según sus relaciones epistáticas. Una consecuencia paradójica de estas predicciones es que el coste de la resistencia, muy común para muchos antibióticos (Schrage y Perrot 1996; Reynolds 2000), permitiría a las poblaciones bacterianas una mayor exploración de las combinaciones múltiples de mutaciones.





# 5 El espectro mutacional y la emergencia de estirpes mutadoras

## 5.1 Introducción

A pesar de que las mutaciones espontáneas son mucho más frecuentemente deletéreas que beneficiosas, las poblaciones bacterianas presentan una inesperada capacidad para evolucionar hacia fenotipos hipermutadores, con tasas de mutación de hasta dos o tres órdenes de magnitud más elevadas que el tipo salvaje (Denamur y Matic 2006). La emergencia de estas estirpes hipermutadoras ha recibido mucha atención debido a su doble interés clínico y evolutivo, y ha sido explicada en términos de la mayor probabilidad que exhiben los alelos mutadores para experimentar selección indirecta con alguna mutación beneficiosa producida en el mismo genoma (proceso conocido como *hitch-hiking*) (Oliver 2010).

Aunque la selección indirecta ha proporcionado un mecanismo satisfactorio para entender la evolución del fenotipo hipermutador, los modelos actuales presentan problemas a la hora de explicar al menos dos observaciones experimentales. Primero, los modelos predicen que la probabilidad de fijación de un alelo mutador en una población será mayor cuanto mayor el grado de oportunidad adaptativa (esto es, el número y los efectos sobre la aptitud de las mutaciones beneficiosas disponibles en un determinado ambiente) (Tenaillon y cols. 1999). Sin embargo, varios trabajos de evolución experimental con oportunidades adaptativas comparables han informado de frecuencias muy diferentes de emergencia de estirpes hipermutadoras (Maharjan y cols. 2006; Notley-McRobb y cols. 2002). Segundo, los modelos predicen que oportunidades adaptativas diferentes seleccionarán alelos mutadores con tasas de mutación diferentes (Tenaillon y cols. 1999). A pesar de que en *E. coli* se han descrito más de treinta posibles alelos mutadores (Miller 1996), tanto experimentos como aislados naturales muestran un marcado sesgo hacia alelos con un fenotipo fuerte, particularmente aquellos causados por defectos en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos (Denamur y Matic 2006).

Estas inexactitudes pueden adscribirse, en parte, al hecho de que los detalles dinámicos de la selección indirecta de alelos mutadores son todavía motivo de controversia. Así, algunos autores proponen que la fijación de alelos mutadores involucra varios eventos de selección indirecta consecutivos, bien sean motivados por otros tantos cambios ambientales, o bien por la concurrencia simultánea de varios genomas con mutaciones beneficiosas (Tanaka y cols. 2003; Leigh 1970; Tenaillon y

cols. 1999). Otros, por su parte, consideran que este fenómeno sucede principalmente como resultado de un único evento, que lleva al alelo mutador de ser raro a fijarse en la población (Wylie y cols. 2009). Estas controversias llevan a diferentes predicciones acerca de factores como el tamaño poblacional o el efecto de las mutaciones deletéreas, lo que dificulta la explicación de los patrones de evolución de hipermutadores mencionados con anterioridad.

Una característica prominente de los alelos mutadores que no ha sido tenida en cuenta hasta la fecha es que cada cual exhibe su propio espectro mutacional, lo que significa que el incremento en la tasa de mutación no es general sino que se limita en exclusiva a ciertos tipos de mutaciones (Miller 1996). Este espectro viene determinado por el sistema de prevención o reparación de daño en el ADN que es alterado por la mutación del *locus* mutador en cuestión. En la línea de lo sugerido por Nottley-MacRobb y Ferenci (Nottley-McRobb y cols. 2002) y Maclean y cols. (MacLean y cols. 2010), la hipótesis de la que parte este trabajo es que el acceso diferencial a mutaciones beneficiosas impuesto por las diferencias espectrales podría afectar en algún grado a la selección indirecta, si se cumple que esas mutaciones beneficiosas presentan variabilidad en cuanto a la aptitud que confieren. Aquellos alelos mutadores que en promedio generen mutaciones beneficiosas con mayor efecto tendrán una mayor probabilidad de alcanzar la fijación, mientras que aquellos que en promedio las generen más débiles lo tendrán más complicado. La probabilidad de fijación de los alelos mutadores estará, por lo tanto, determinada no sólo por su tasa de mutación, sino también por su espectro mutacional. Para explorar esta hipótesis, hemos caracterizado aquí la distribución de efectos en aptitud de las mutaciones beneficiosas generadas por diferentes estirpes hipermutadoras de *E. coli*. Los resultados demuestran que el espectro mutacional puede fácilmente sesgar estas distribuciones, condicionando en última instancia la habilidad competitiva de cada hipermutador en cada ambiente. Por último, hemos estudiado, mediante el empleo de simulaciones por ordenador, el efecto en la dinámica de selección indirecta que pueden causar estas desviaciones en la habilidad competitiva provocadas por diferencias espectrales.

## **5. 2 Materiales y métodos**

### **5.2.1 Sistema experimental**

En este trabajo hemos caracterizado las mutaciones beneficiosas producidas por la estirpe salvaje y dos estirpes hipermutadoras de *E. coli*, todas ellas derivaciones de la

cepa MG1655 cedidas gentilmente por Bjedov y cols. (Bjedov y cols. 2003). Las estirpes hipermutadores son, respectivamente, mutantes de escisión de los genes *mutT* y *mutY*, que codifican para las proteínas homónimas del sistema GO. Ambos *loci* mutadores han aparecido afectados espontáneamente en estirpes hipermutadoras aisladas en experimentos de evolución con *E. coli*. Debido a que las mutaciones beneficiosas son extremadamente raras y por tanto difíciles de detectar, nuestro diseño experimental se ha valido de un tipo especial como son las mutaciones de resistencia a antibióticos. La selección de estas mutaciones se llevó a cabo mediante el crecimiento en medio LB a 37° y la posterior siembra de una alícuota de cada población en placas Petri con LB agar (1%) suplementadas con los siguientes antibióticos, según correspondiese: tetraciclina (15 mg/L), rifampicina (100 mg/L) y estreptomycin (100 mg/L). El tiempo de incubación fue de 24 h, excepto para las placas con estreptomycin, donde se prolongó hasta 42 h.

### 5.2.2 Ensayos de crecimiento

Para utilizar alícuotas del tamaño adecuado que asegurasen una baja densidad de unidades formadoras de colonias (UFC~50/placa), la tasa de mutación de cada estirpe para cada antibiótico fue estimada de antemano. Tras la siembra y posterior incubación se aislaron colonias de forma aleatoria (en función de su proximidad a un punto arbitrario) y se procedió a su completa resuspensión en solución salina. Mediante la dilución y siembra en LB agar de esta solución se calculó el número de individuos viables de cada colonia ( $N$ ). Asumiendo que cada colonia se originó a partir de una única célula, el número de generaciones se calculó como  $\log_2 N$  y la tasa de crecimiento como el número de generaciones por hora.

### 5.2.3 Competiciones

Para iniciar las competiciones, se mezclaron cultivos de una noche de cada estirpe con el tipo salvaje en una proporción preestablecida, basada en sus tasas de mutación. La mezcla se sembró en placas de LB con antibiótico y la competición se incubó durante 24 h (42 h en el caso de la estreptomycin). El resto no utilizado de los cultivos de una noche se utilizó para estimar sus frecuencias de mutantes a cada antibiótico, necesaria para conocer el número inicial de cada competidor. Para poder distinguirlas del tipo salvaje, las estirpes hipermutadoras portaban marcadores de resistencia a antibiótico (cloranfenicol y kanamicina) (Bjedov y cols. 2003) los cuales no impusieron ninguna merma significativa en la aptitud de dichas estirpes bajo nuestras condiciones

experimentales ( $n=4$ ,  $P>0.28$ , test de la U de Mann-Whitney, bilateral, en ambos casos). Al final de la competición, las placas fueron lavadas y resuspendidas en solución salina y la proporción final del hipermutador frente al tipo salvaje obtenida mediante la siembra de las diluciones apropiadas, en paralelo, en placas de LB y placas de LB con cloranfenicol o kanamicina. La aptitud relativa de cada genotipo se calculó a partir de las proporciones iniciales y finales de cada competidor, siguiendo la fórmula estándar (Lenski y cols. 1991).

## 5.2.4 Simulaciones por ordenador

Para estudiar de la probabilidad de fijación de un alelo mutador en función del sesgo impuesto por su espectro mutacional, se desarrolló un modelo computacional en lenguaje R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) que simula el cultivo seriado de una población asexual, fundado a partir de una única célula, en condiciones de laboratorio donde sólo una mutación beneficiosa está disponible. Los genotipos se definen mediante tres *loci*: *B*, *D* y *M*. El primer *locus* codifica la ausencia ( $b=0$ ) o presencia ( $b=1$ ) de la mutación beneficiosa, el segundo controla el número de mutaciones deletéreas acumuladas ( $d$ ), y el último la ausencia ( $m=0$ ) o presencia ( $m=1$ ) de un alelo mutador que confiere un aumento de cien veces en la tasa de mutación. El genotipo salvaje, por tanto, se define inequívocamente como *000*.

A cada generación, los individuos no mutadores se reproducen determinísticamente de acuerdo con la tasa de crecimiento ( $r_{bd0}$ ) definida por su genotipo (*bd0*):

$$r_{bd0} = 2 + bs_b + ds_d \quad (1)$$

donde  $s_b$  y  $s_d$  representan los coeficientes de selección beneficioso y deletéreo, respectivamente. La población crece exponencialmente hasta que su tamaño supera los  $10^8$  individuos, tras lo cual se extrae una muestra aleatoria de  $10^5$  individuos, un cuello de botella moderado (de Visser y cols. 1999), a partir de los cuales se funda la siguiente población. La simulación se detiene cuando la mutación beneficiosa se fija completamente bien en el fondo genético hipermutador, bien en el tipo salvaje.

El efecto del espectro mutacional se implementó como un sesgo en el promedio del coeficiente de selección beneficioso, definiendo la tasa de crecimiento de los genotipos hipermutadores (*bd1*) como:

$$r_{bd1} = 2 + bs_b \sigma + ds_d \quad (2)$$

donde  $\sigma$  representa precisamente este efecto.

En el diseño del programa se ha tenido en cuenta que la ecuación (2) sea sólo aplicada a los genotipos hipermutadores adaptados (*1d1*) generados a partir de otro genotipo hipermutador (*0d1*), y no en aquellos generados a partir de un tipo salvaje adaptado (*1d0*) mediante mutación del *locus M*, caso infrecuente pero no por ello despreciable.

Las transiciones entre genotipos se modelizaron como sigue. En cada generación, tras la reproducción, todos los tipos de mutaciones se implementan mediante la generación de números pseudoaleatorios distribuidos según una distribución de Poisson (Tenaillon y cols. 1999), de acuerdo con la abundancia de cada genotipo y un conjunto predefinido de tasas de mutación (que actúan como parámetro de la distribución de Poisson). Las tasas de mutación fueron establecidas en el rango conocido de *E. coli*,  $10^{-7}$  para las mutaciones beneficiosas (Rozen y cols. 2002),  $10^{-4}$  para las deletéreas (Trindade y cols. 2010) y  $5 \times 10^{-6}$  para la adquisición de un genotipo mutador (Boe y cols. 2000). La tasa de mutación letal se introdujo con un valor de  $10^{-5}$ , basado en trabajos previos (Taddei y cols. 1997; Tenaillon y cols. 1999). La reversión se consideró insignificante. La variación de un orden de magnitud en los valores de esos parámetros no mostró ningún cambio cualitativo en los resultados.

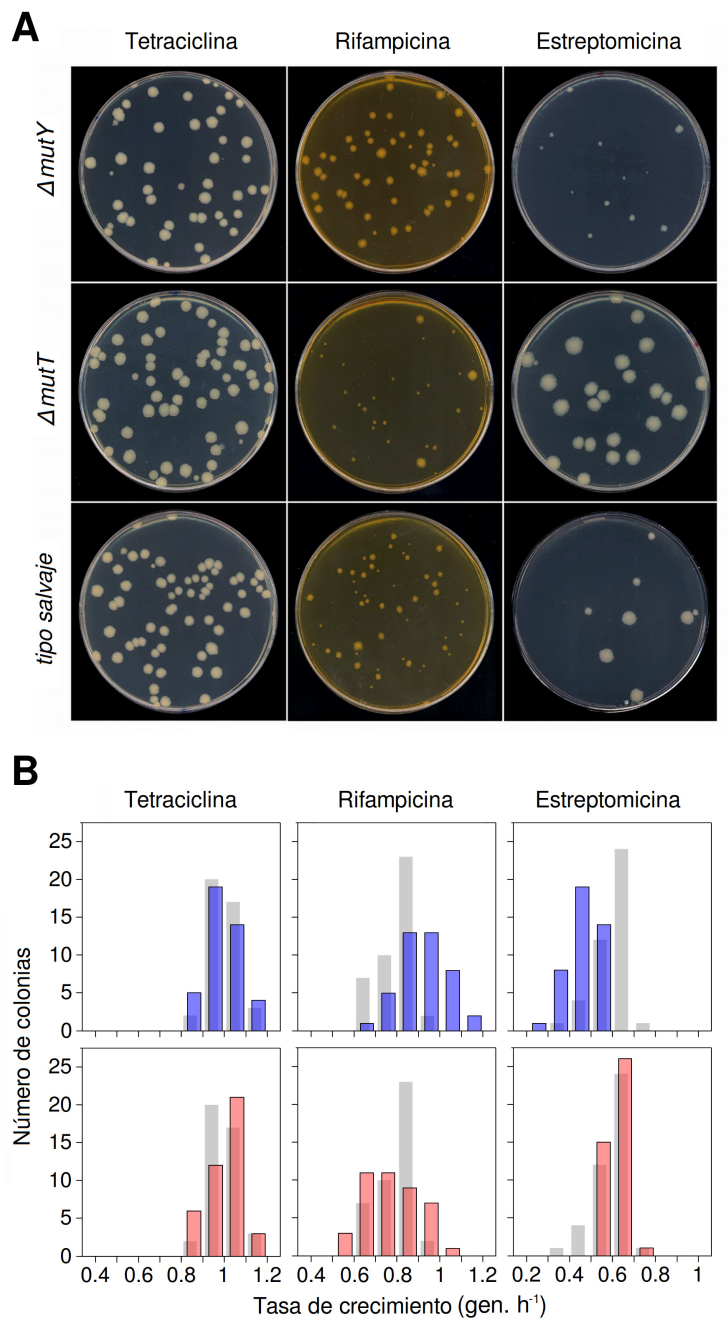
## 5.3 Resultados y discusión

Para evaluar si diferencias en el espectro mutacional se traducen en diferencias significativas en aptitud, se sembraron cultivos de una noche de las estirpes salvaje,  $\Delta mutT$  y  $\Delta mutY$  de *E. coli* en placas suplementadas con tres antibióticos: rifampicina, estreptomicina y tetraciclina. Los mutantes resistentes a rifampicina y estreptomicina exhibieron un acusado polimorfismo en el tamaño colonial (ver figura 5.1). La resistencia a esos antibióticos emerge fácilmente mediante mutaciones en los genes que codifican para sus dianas, la ARN polimerasa (Garibyan y cols. 2003) y la subunidad 30s del ribosoma (Timms y cols. 1992), respectivamente. Se sabe que muchas de estas mutaciones impiden en diferente grado la correcta función de esas maquinarias moleculares, por lo que no es sorprendente que los mutantes exhiban diferencias en crecimiento. Ahora bien, tanto el tipo salvaje como las estirpes hipermutadoras presentan polimorfismos característicos, lo que es consistente con las predicciones de nuestra hipótesis. Como control de que el acceso diferencial a mutaciones beneficiosas con diferentes efectos en aptitud es el único factor responsable de este fenómeno, las

estirpes usadas en este trabajo portan una inserción que contiene un gen de resistencia a tetraciclina y su represor constitutivo (Bjedov y cols. 2003). Debido a que la probabilidad de adquirir resistencia a altas concentraciones de este antibiótico por mutación puntual en *E. coli* es despreciable, la resistencia sólo puede aparecer aquí como consecuencia de mutaciones de pérdida de función que anulen la represión. Todas estas mutaciones se traducen en el mismo mecanismo de resistencia, y por lo tanto no se esperan diferencias de aptitud entre los mutantes de resistencia a tetraciclina. De hecho, esos mutantes exhibieron un bajo grado de polimorfismo en el tamaño colonial; diferencias, en todo caso, aparentemente independientes de la estirpe, y que probablemente reflejan la variabilidad fenotípica inherente a casi todos los caracteres.

Para evaluar de forma más cuantitativa estas diferencias, se seleccionaron al azar 42 colonias resistentes para cada combinación de genotipo y antibiótico, y se procedió a la estimación de su tasa de crecimiento, usada aquí como indicadora de aptitud. En rifampicina, la distribución de tasas de crecimiento entre los mutantes generados por la estirpe  $\Delta mutY$  muestra un marcado sesgo hacia la derecha, comparada con las distribuciones que corresponden a las estirpes  $\Delta mutT$  y salvaje (figura 5.1, centro). En estreptomicina, la situación es exactamente la contraria (figura 5.1, derecha) ( $n=42$ ,  $P<0.0001$ , test unilateral y dos muestras de Kolmogorov-Smirnov, para todos los casos).

Estos resultados sugieren que ciertas substituciones G:C→T:A en el gen *rpoB* (la transversión característica provocada por la ausencia de MutY) dan lugar a alelos que codifican para ARN polimerasas que resisten a rifampicina sin clara pérdida de funcionalidad; mientras que ese mismo tipo de substituciones, en el gen *rpsL*, originan proteínas ribosomales S12 resistentes a estreptomicina con gran coste en términos de aptitud. Un razonamiento similar puede aplicarse a los resultados obtenidos con la estirpe  $\Delta mutT$ , cuyo espectro es específico de transversiones A:T→C:G. En el caso de la tetraciclina, no se encontraron diferencias significativas entre el tipo salvaje y las estirpes hipermutadoras (figura 5.1 izquierda) ( $n=42$ ,  $P>0.18$ , test bilateral y dos muestras de Kolmogorov-Smirnov). Con el objeto de confirmar esta interpretación, se seleccionaron al azar 10 nuevas colonias resistentes para cada combinación de genotipo y antibiótico, se midió su tasa de crecimiento, y se secuenciaron sus genes *rpoB* y *rpsL* (figura 5.2). En respaldo de nuestra hipótesis, varias substituciones G:C→T:A encontradas en *rpoB* permiten explicar la mayor aptitud de los mutantes resistentes a rifampicina generados por la estirpe  $\Delta mutY$ . La clase con mayor aptitud en la distribución correspondiente a esta estirpe (figura 5.1, centro) es probable que esté constituida por mutantes V146F, el mutante que ha exhibido mayor tasa de crecimiento (figura 5.2). La misma transversión



*Figura 5.1.- Efectos del espectro mutacional en la generación de mutantes resistentes a antibióticos en el tipo salvaje de E. coli y dos mutantes hipermutadores. (A) Polimorfismo característico del tamaño de colonia generado por cada cepa en tetraciclina (izquierda), rifampicina (centro) y estreptomicina (derecha). Las mutaciones que confieren resistencia a rifampicina y estreptomicina afectan al crecimiento bacteriano en distintos grados y se producen de manera diferente según el espectro mutacional. La tetraciclina funciona como control, dado que las mutaciones que confieren resistencia a dicho antibiótico no se espera que presenten variabilidad en la tasa de crecimiento.*

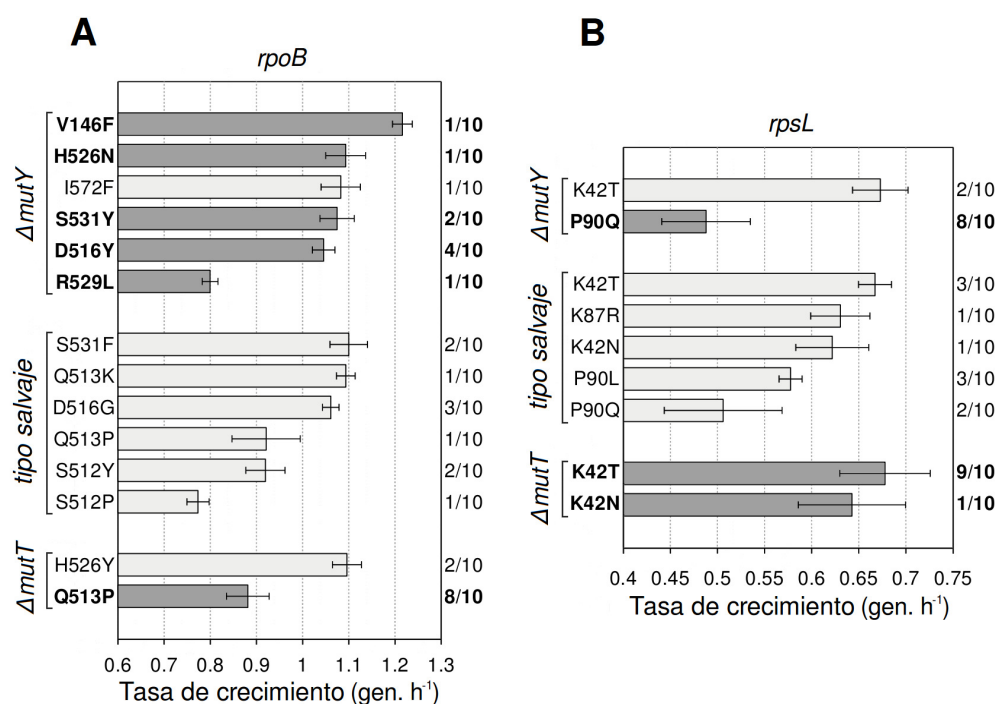


Figura 5.2.- Mutaciones que confieren resistencia a antibióticos generadas por el tipo salvaje y los hipermutadores. Tasa de crecimiento (media  $\pm$  desviación estándar;  $n=3$ ) de los resistentes con la mutación especificada. Las barras color gris oscuro denotan mutaciones que corresponden al espectro mutacional de cada hipermutador. En el eje derecho se muestra la frecuencia de aparición de cada mutación. Todas las substituciones aquí mostradas han sido previamente descritas en la literatura. (A) Mutaciones en *rpoB*, que confieren resistencia a rifampicina. (B) Mutaciones en *rpsL*, que confieren resistencia a estreptomicina.

característica de esta estirpe, en otras posiciones del gen, originó los mutantes H526N y S531Y, también detentores de una alta tasa de crecimiento. En el caso de los mutantes de  $\Delta mutT$ , el enriquecimiento de su distribución en bajas tasas de crecimiento puede ser explicada, al menos en parte, por el mutante Q513P, generado precisamente mediante una substitución A:T  $\rightarrow$  C:G. En lo que se refiere a los mutantes resistentes a estreptomicina, las diferencias en aptitud pueden del mismo modo ser explicadas por el efecto de las substituciones características de cada espectro en el gen *rpsL*. La baja aptitud de los mutantes originados por la estirpe  $\Delta mutY$  refleja probablemente la predominancia del mutante P90Q (8/10 casos), mientras que la alta aptitud de los mutantes de  $\Delta mutT$  podrían ser debidos a la prevalencia del mutante K42T (9/10).

Resulta tentador el asumir que si la distribución de aptitud de una estirpe dada se halla alterada respecto a la del tipo salvaje, del mismo modo entonces se comportará

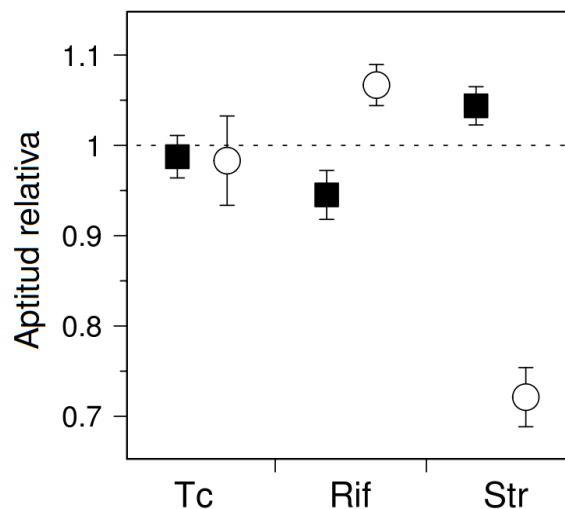


la aptitud promedio de dicha estirpe. Sin embargo, las distribuciones mostradas en la figura 5.1 muestran formas irregulares y distintos grados de solapamiento, con lo que consideramos necesario probar esta hipótesis realizando medidas de aptitud mediante competición directa. Consistentes con lo que sugería la examinación visual de la figura 5.1, los resultados mostraron diferencias significativas en la aptitud de ambas estirpes hipermutadoras tanto en rifampicina como en estreptomicina (figura 5.3) ( $n=4$ ,  $P<0.012$ , test de la U de Mann-Whitney, unilateral, en todos los casos).

La evidencia experimental aquí presentada indica que en un ambiente determinado, cada estirpe hipermutadora tiene asociada su propia distribución de efectos en aptitud de mutaciones beneficiosas, y que estas diferencias pueden afectar a su habilidad competitiva respecto al tipo salvaje. Los modelos teóricos predicen que la probabilidad de fijación de un alelo mutador depende del coeficiente de selección de la mutación beneficiosa con la cual es seleccionado de forma indirecta (Tenaillon y cols. 1999). De acuerdo con nuestros resultados, este coeficiente, a su vez, depende del espectro mutacional; y por lo tanto el espectro mutacional podría jugar un papel fundamental en la dinámica de selección indirecta. Para evaluar esta posibilidad se llevó a cabo un estudio mediante simulaciones por ordenador, basado en trabajos previos (Taddei y cols. 1997; Tenaillon y cols. 1999). El modelo simula el cultivo seriado de una población no mutadora de bacterias, creciendo en un medio donde sólo es posible una única mutación beneficiosa. Las estirpes hipermutadoras, originadas a partir de las no mutadoras, exhiben una tasa de mutación para adquirir la mutación beneficiosa cien veces mayor que éstas. La simulación termina una vez que la mutación beneficiosa se fija completamente en cualquiera de los fondos genéticos. El efecto del espectro mutacional ( $s$ ) se introdujo como un factor multiplicativo que modifica el coeficiente de selección ( $s$ ) de la mutación beneficiosa, exclusivamente en el fondo hipermutador.

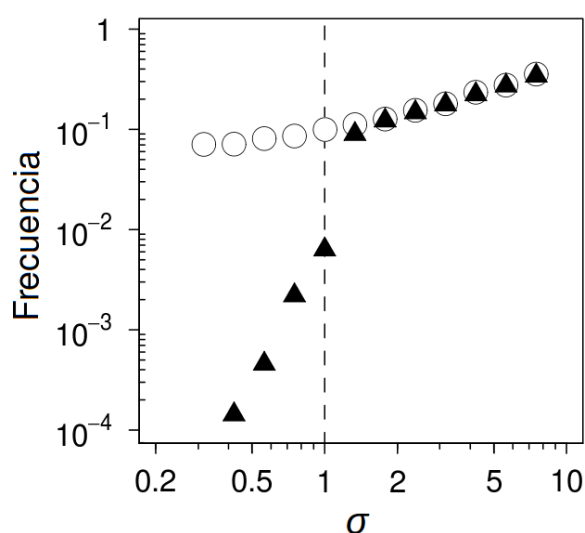
Las simulaciones mostraron que  $s$  ejerce una modesta influencia en el establecimiento de los genotipos hipermutadores portadores de la mutación beneficiosa (esto es, en su probabilidad de escapar la acción de la deriva génica) (figura 5.4). Este efecto no es sorprendente, ya que la probabilidad de que una mutación beneficiosa sobreviva a la deriva es de aproximadamente  $2s$  (Kimura y Maruyama 1966). Ahora bien,  $s$  ejerce una fuerte influencia en el destino de aquellos genotipos adaptados que ya han escapado la acción de la deriva, y se hallan en pleno proceso de fijación o interferencia clonal. En ausencia de efecto alguno del espectro ( $s=1$ ), un genotipo hipermutador adaptado sólo puede fijarse si consigue hacerlo antes de que cualquier genotipo salvaje adaptado escape a la deriva; en caso contrario, debido a su mayor carga deletérea, el tipo salvaje siempre lo acabará desplazando (figura 5.5, fila

superior). Esta dinámica no cambia cualitativamente cuando el efecto del espectro disminuye el coeficiente de selección de la mutación beneficiosa en los genotipos hipermutadores ( $s < 1$ ). La fijación hipermutadora está aún más desfavorecida debido, por un lado, al aumento de la intensidad de la deriva; y por otro, a que el proceso de fijación es más lento, lo que resulta en un incremento de la probabilidad de que un genotipo salvaje adaptado escape la deriva. Sin embargo, cuando el efecto del espectro confiere ventaja a los hipermutadores ( $s > 1$ ), aparece un valor umbral a partir del cual la dinámica cambia completamente. El valor de este umbral viene determinado por el valor de  $s$  que compensa la mayor carga deletérea de los genotipos hipermutadores. Por encima de este valor el hipermutador adaptado es más apto que su homólogo salvaje, y por lo tanto sólo necesita escapar a la deriva para alcanzar la fijación (figura 5.5, fila inferior). Como consecuencia, la probabilidad de fijación del alelo mutador se incrementa substancialmente. Es interesante hacer notar que la carga deletérea es generalmente un valor muy pequeño, del orden de la propia tasa de mutación (Kimura y Maruyama 1966); con lo que tan sólo pequeñas desviaciones en  $s$  son suficientes para convertir la emergencia de estirpes mutadoras en un suceso bastante probable.



*Figura 5.3.- Experimentos de competición entre mutantes resistentes a antibiótico generados por el tipo salvaje y las cepas mutadoras de E. coli. Aptitud (media  $\pm$  desviación estándar;  $n=4$ ) de los mutantes resistentes a antibióticos generados por  $\Delta\text{mutY}$  (círculos) y  $\Delta\text{mutT}$  (cuadrados). La aptitud es relativa a la del tipo silvestre; la línea discontinua señala ausencia de diferencias. Nótese que se espera que la abundancia relativa de mutantes varíe entre las réplicas, dado que los mutantes se generaron de modo estocástico durante el periodo de crecimiento anterior a la competición.*

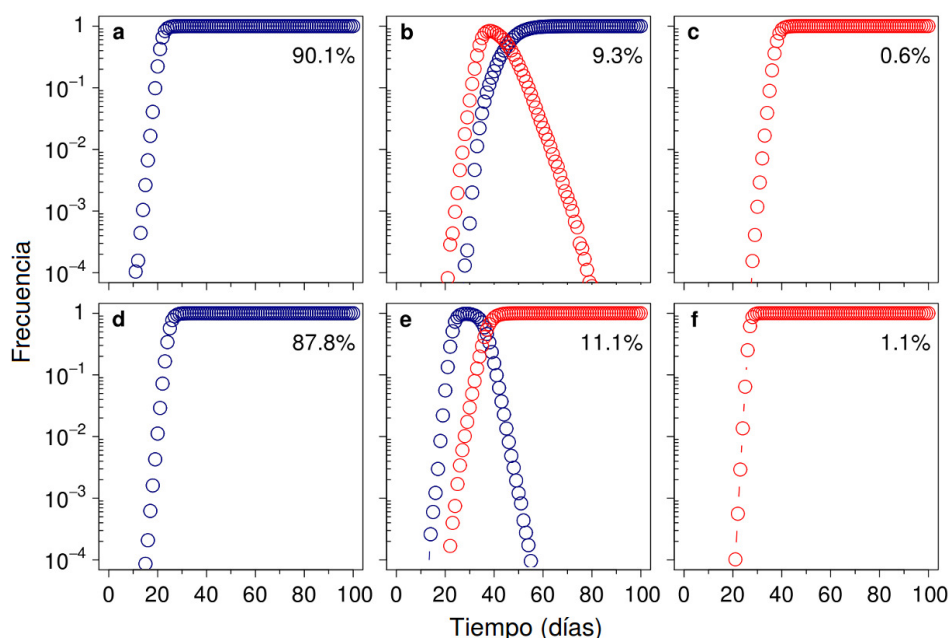
La evolución de las estirpes hipermutadoras ha sido entendida hasta la fecha exclusivamente en términos del mayor número de mutaciones que generan. En conjunto, nuestros resultados muestran que no sólo el número, sino también el tipo de mutaciones es relevante para este proceso. El único requisito para que el espectro mutacional pueda afectar al coeficiente de selección promedio, y por ende a la dinámica evolutiva, es que el *locus* o *loci* sujetos a selección pueda albergar mutaciones con diferentes efectos en la aptitud. Es esta una condición bastante poco restrictiva, susceptible de cumplirse en numerosos escenarios adaptativos. Dos casos prominentes serían las resistencias a tanto virus bacteriófagos (Pal y cols. 2007) como a antibióticos (Andersson y Hughes 2010), precisamente dos de los agentes selectivos más importantes que se han propuesto para explicar la presencia de estirpes hipermutadores en determinadas poblaciones naturales.



*Figura 5.4.- Simulaciones computacionales de los efectos del espectro mutacional en la dinámica de hitch-hiking. El espectro mutacional puede sesgar la aptitud promedio de los mutantes producidos por cada mutador, comparados con los producidos por el tipo salvaje. Este sesgo se modelizó como un factor multiplicativo ( $\sigma$ ), tal que cuando  $\sigma = 1$  no existen diferencias en la ventaja selectiva que confiere la mutación beneficiosa en cada fondo. Los círculos representan la frecuencia de simulaciones en las que el mutador escapó a la deriva, mientras que los triángulos representan la frecuencia en la que dicho alelo alcanzó la fijación.*

Una propuesta interesante para el futuro sería determinar hasta qué punto los patrones de abundancia relativa de estirpes mutadoras se pueden explicar, al menos en parte, por los efectos que sus espectros mutacionales hayan podido tener sobre las

mutaciones sucesivas responsables de la adaptación al medio. En el contexto clínico este tipo de estudios podrían evaluar que antibióticos presentan menor propensión a seleccionar estirpes hipermutadores, información relevante debido a que éstas se consideran factor de riesgo para el fallo de la terapia antibiótica (Oliver y Mena 2010).



*Figura 5.5.- Efecto del espectro mutacional en la dinámica del hitch-hiking. Resultados de simulaciones típicas mostrando el cambio en frecuencia del tipo salvaje (azul) y el hipermutador adaptado (genotipos 100 y 101) (rojo), para  $\sigma = 1$  (A-C) y  $\sigma = 1.8$  (D-F). La mutación beneficiosa confiere un aumento en aptitud del 10% ( $s_b = 0.2$ ), mientras que cada mutación deletérea la reduce un 2% ( $s_d = 0.04$ ). Todos los resultados pueden ser clasificados en tres casos: sólo el tipo salvaje escapa a la deriva (A y D), ambos genotipos escapan a la deriva (B y E), o sólo el hipermutador adaptado escapa a la deriva (C y F). Los porcentajes indican el número de réplicas (de un total de 35000) que corresponden con cada caso. A-C, Sin efectos debidos al espectro ( $\sigma = 1$ ), en un 90.1% de los casos la subpoblación salvaje, mucho mayor, genera la mutación beneficiosa y el genotipo salvaje adaptado se fija antes su homólogo mutador siquiera llegue a establecerse (A). En los casos en los que ambos genotipos coexisten (9.3% del total), el tipo salvaje siempre se fija, debido a su menor carga deletérea (B). Esto confina el éxito mutador al 0.6% restante de los casos, en los que son capaces de fijarse antes de que el genotipo salvaje adaptado llegue a establecerse (C). D-F, Cuando los efectos del espectro son tenidos en cuenta ( $\sigma = 1.8$ ), los mutadores no sólo escapan de la deriva más frecuentemente sino que, debido a su aptitud incrementada, son capaces de fijarse incluso en presencia del tipo salvaje adaptado (E). Como consecuencia, se produce un aumento substancial de los casos donde los mutadores alcanzan la fijación (11.1% + 1.1% = 12.2% frente a 0.6% cuando  $\sigma = 1$ ).*

El hecho de que incluso pequeños efectos debidos al espectro mutacional pueden alterar dramáticamente la selección indirecta de alelos mutadores, junto con la aparente abundancia de circunstancias que permitan este fenómeno, nos llevan a concluir que el espectro mutacional debe jugar un papel central en la evolución de altas tasas de mutación tanto en bacterias como en otros sistemas asexuales, como es el caso de las células tumorales (Prindle y cols. 2010).



## 6 El espectro mutacional y la repetibilidad de la evolución molecular

### 6.1 Introducción

Una de las preguntas clásicas en Biología es hasta qué punto los resultados de la evolución son contingentes o deterministas. Dadas las múltiples combinaciones de cambios genéticos que *a priori* podrían suponer una mejora en aptitud, la elección de una u otra trayectoria evolutiva se ha entendido habitualmente como un proceso supeditado a la contingencia histórica, y por tanto esencialmente impredecible (Gould 1991). A escala microevolutiva, sin embargo, múltiples estudios de evolución experimental han venido describiendo casos de evolución paralela, en donde linajes independientes fundados a partir del mismo ancestro acumulan mutaciones en los mismos genes e incluso en las mismas posiciones (Wichman y cols. 1999; Cooper y cols. 2008; Tenaillon y cols. 2012). Este paralelismo se ha entendido como el resultado, en parte, de las restricciones impuestas por la arquitectura genética de los caracteres sometidos a selección (McDonald y cols. 2009). Un caso particularmente extremo sucede cuando las mutaciones exhiben epistasia de signo, esto es, cuando las mutaciones son beneficiosas o deletéreas en función de la presencia o ausencia de otras mutaciones (Weinreich y cols. 2006). En tales circunstancias conjuntos completos de mutaciones se vuelven mutuamente exclusivas, lo que en última instancia obliga a la evolución a transcurrir por un número limitado de trayectorias mutacionales.

Aparte de las restricciones genéticas, la evolución paralela ha sido también interpretada como resultado de la acción de la selección (Wichman y cols. 1999). Independientemente del número de trayectorias mutacionales que permita la arquitectura genética, la elección entre éstas no es completamente aleatoria. Esto es debido a que este proceso se encuentra sesgada por la tasa de suministro y el efecto en aptitud de las mutaciones iniciales de cada trayectoria. En teoría, cuanto mayor sea la tasa de suministro (el producto del tamaño poblacional y la tasa de mutación) menor será la estocasticidad de este proceso, puesto que una alta tasa hace más probable que las mutaciones más beneficiosas estén disponibles para la selección (Handel y Rozen 2009). Esta predicción ha sido recientemente demostrada en experimentos de evolución con microorganismos, aunque sólo parcialmente. En efecto, estos trabajos mostraron cómo las trayectorias mutacionales son más repetitivas en poblaciones grandes que en poblaciones pequeñas (Rozen y cols. 2008). Sin embargo, aunque la tasa de suministro

es una función creciente de tanto el tamaño poblacional como la tasa de mutación, ambos parámetros no son interconvertibles en términos evolutivos debido al efecto que tiene el tamaño poblacional sobre diversos aspectos de la dinámica de poblaciones. Existe, además, otra importante diferencia entre la tasa de mutación y el tamaño poblacional, prácticamente inexplorada; y es que la variación en la tasa de mutación en bacterias casi nunca afecta simultáneamente a todos los tipos mutacionales (Miller 1996). Esto es debido, como discutimos en el capítulo anterior, a que las bacterias hipermutadoras se originan mediante la alteración de diversos mecanismos de prevención o reparación de daño en el ADN, cuya disfunción da como resultado un espectro mutacional característico. Como consecuencia de este espectro mutacional, la proporción relativa de mutaciones iniciales disponibles para la selección será diferente en cada población de bacterias hipermutadoras. En este capítulo investigaremos si, a pesar de presentar un suministro mutacional más elevado, las bacterias hipermutadoras pueden ser conducidas por su espectro mutacional a trayectorias mutacionales subóptimas.

Para evaluar esta posibilidad, hemos caracterizado las mutaciones acumuladas por dos estirpes hipermutadoras ( $\Delta mutT$  y  $\Delta mutH$ ) y la estirpe salvaje de *E. coli* durante un experimento de evolución de resistencia a altas concentraciones del antibiótico beta-lactámico cefotaxima. Ambas estirpes hipermutadores exhiben una elevación similar de la tasa de mutación (en torno a dos órdenes de magnitud superior al tipo salvaje), pero difieren completamente en su espectro mutacional. Mientras que los defectos en *mutT* conllevan un incremento en las transversiones A:T→C:G, los defectos en *mutH* se asocian específicamente con elevaciones en la frecuencia de *indels* y de las transiciones A:T→G:C y G:C→A:T (Miller 1996). El diseño experimental consistió en la propagación seriada de 96 poblaciones independientes de cada estirpe, incluido el tipo salvaje; doblando la concentración de cefotaxima cada dos días hasta alcanzar una concentración ~1000 veces mayor que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de partida.

Con el objeto de contar con una diana mutacional fácil de caracterizar, todas las estirpes fueron construidas con al menos una copia del gen codificante para la enzima beta-lactamasa TEM-1. Esta enzima es un ejemplo paradigmático de evolución molecular limitada por la epistasia de signo (Salverda y cols. 2011). El alelo primigenio, adaptado perfectamente para la hidrólisis de los primeros beta-lactámicos, dio lugar mediante la acumulación de mutaciones puntuales a cientos de variantes con mayor actividad frente a compuestos más modernos de esta familia (Salverda y cols. 2010). Numerosos trabajos han emulado esta diversificación adaptativa en el laboratorio, usando tanto técnicas *in vitro* como de evolución experimental con microorganismos de



acuerdo con sus intereses específicos. En general, tanto las observaciones naturales como las experimentales muestran claros patrones de asociación entre mutaciones, que resultan consistentes con la existencia de epistasia de signo (Salverda y cols. 2010). En el caso concreto de las mutaciones de resistencia a cefotaxima, el antibiótico aquí empleado, la asociación más frecuente es la de las substituciones G238S y E104K. A nivel nucleotídico, ambas mutaciones surgen de transiciones G:C→A:T, uno de los tipos mutacionales dominantes en el espectro de la estirpe  $\Delta mutH$  utilizada en este estudio. Curiosamente, otras mutaciones conocidas por su contribución a la resistencia a cefotaxima (p. ej: R164H, A237T o E240K) también se originan a partir de esta misma transición (Salverda y cols. 2010). Por el contrario, la transversión característica de la estirpe  $\Delta mutT$  tan sólo se conoce que dé lugar a dos mutaciones, la S268R y la E240A, aisladas sólo *in vitro* y nunca en aislados naturales o en experimentos de evolución (Schenk y cols. 2012). Atendiendo a lo que ya ha sido descrito en anteriores trabajos, por tanto, no cabría esperar que la estirpes  $\Delta mutT$  presenten una ventaja respecto al tipo salvaje similar a la esperada para los  $\Delta mutH$ .

Una posible limitación del uso de estirpes hipermutadoras es que varían simultáneamente el espectro mutacional y la tasa de mutación. Con el objeto de desacoplar ambos factores, introdujimos una variable experimental adicional, el número de copias del gen codificante para la enzima TEM-1 (*bla<sub>TEM-1</sub>*). Así, se utilizaron estirpes con una única copia cromosómica del alelo *bla<sub>TEM-1</sub>* y estirpes con múltiples copias (~20) portadas en plásmido. Globalmente, se emplearon seis condiciones experimentales (tres espectros mutacionales y dos tamaños de diana); dando lugar a un total de 576 poblaciones independientes.

## 6. 2 Materiales y métodos

### 6.2.1 Estirpes y medios

Todas las estirpes aquí empleadas se han obtenido mediante modificaciones de la cepa AB1157 de *E. coli*. Esta cepa contiene un gen críptico que codifica para la beta-lactamasa AmpC. Para prevenir interferencias con nuestro sistema experimental, este gen fue eliminado mediante la transducción mediada por P1 del alelo *ampC::Km* de la colección Keio (Baba y cols. 2006). Las estirpes hipermutadoras fueron construidas eliminando los genes  $\Delta mutT$  y  $\Delta mutH$  con el mismo protocolo. Los *cassettes* de resistencia a kanamicina se escindieron posteriormente utilizando el plásmido pCP20 (Datsenko y Wanner 2000). Para construir las estirpes portadoras de una única copia

del gen *bla<sub>TEM-1</sub>*, el gen *galK* fue substituido mediante transducción por el *cassette galK::cfp/yfp*, *bla<sub>TEM-1</sub>* a partir de una cepa MC4100 obtenida de Hargreaves y cols. (Hargreaves y cols. 2006). La construcción de las estirpes con múltiples copias del gen *bla<sub>TEM-1</sub>* fue llevada a cabo mediante transformación con el plásmido pBRACI; un derivado del pBR322 al que, para reducir su coste en aptitud, se le ha escindido el *cassette* de resistencia a tetraciclina digiriendo con las enzimas *AvaI* y *PstII*.

Con el objeto de favorecer el crecimiento de las estirpes lo máximo posible, el medio utilizado en todos los experimentos es una variante optimizada del medio mínimo con sales M9. La diferencia con la receta clásica es que este medio está suplementado con glucosa al 40% y un hidrolizado ácido de caseína al 16% (Casamino Acids<sup>TM</sup>, BD, MD21152, USA).

## 6.2.2 Sistema experimental

Por cada una de las 6 estirpes aquí empleadas se fundaron 96 poblaciones independientes mediante la inoculación de 0.8 ml de medio con 16  $\mu$ l de cultivo nocturno. Estas poblaciones se mantuvieron en placas de 96 pocillos de 1.1 ml (*Deep Well*, Axygen, CA94587, USA), cubiertas con tapas de plástico para permitir aireación. En un intento por prevenir la contaminación cruzada, las poblaciones se dispusieron siguiendo un patrón ajedrezado, de tal modo que sólo la mitad de los pocillos contuviera bacterias. Cada día, tras una incubación de 24 horas a 37°C sin agitación, 16  $\mu$ l por pocillo se transfirieron a una nueva placa. La concentración de cefotaxima el primer día fue de 0.016 mg/L, el equivalente a  $\frac{1}{4}$  de la CMI (estimada por el método de microdilución). Bajo esta concentración subinhibitoria, se calculó que las poblaciones alcanzaban un tamaño final de  $\sim 10^7$  UFC/ml. La concentración de antibiótico se fue doblando cada dos días. También cada dos días se procedió a anotar el número de poblaciones supervivientes según el crecimiento aparente observado y a almacenar las placas a -80°C. Este protocolo se repitió durante 28 días, hasta alcanzar una concentración de cefotaxima de 64 mg/L, o lo que es lo mismo, de 1024 veces la CMI original.

## 6.2.3 Ensayos fenotípicos

Tras la finalización de la evolución experimental, se procedió al aislamiento mediante estría en medio con agar de una colección de 58 linajes representativos de los 576 totales. Los aislados se obtuvieron de la última concentración donde fue detectado crecimiento para cada linaje. Tras su cultivo durante 24 horas, la colección se almacenó

a -80°C en placas de 96 pocillos para su posterior análisis. Los análisis consistieron en ensayos de resistencia a una batería de compuestos químicos y agentes biológicos, siempre tras dilución 1:100 y recrecimiento de 4 horas de la colección después de su descongelación. Todos los ensayos se realizaron en medio sólido, transfiriendo una alícuota de ~1µl por pocillo con un replicador metálico de 96 cilindros.

En *E. coli*, la bomba AcrAB es la principal vía de expulsión no sólo de beta-lactámicos sino de sustancias tóxicas en general (Okusu y cols. 1996). Para estudiar alteraciones en su función se estimó la CMI de acriflavina, tetraciclina y eritromicina; tres sustratos típicos de dicha bomba. Se consideró que un aislado ha sufrido alteraciones siguiendo un criterio conservador: o bien que la CMI para al menos uno de esos tres compuestos haya subido al menos 4 veces, o bien que la CMI para dos de ellos haya subido al menos 2 veces. Para estudiar alteraciones en las porinas OmpF y OmpC, principal vía de entrada de la cefotaxima a la célula (Nikaido y cols. 1983), se evaluó la resistencia a los fagos TuIa y TuIb, que se unen respectivamente a cada una de ellas como primer paso en la infección (Bassford y cols. 1977). El criterio de resistencia se estableció en la producción de un césped de colonias en presencia de un título de virus suficiente para impedir el crecimiento del tipo salvaje.

## 6.2.4 Caracterización de la base genética de la resistencia

En el caso del gen *bla*<sub>TEM-1</sub> portado en copia única cromosómica la amplificación fue llevada a cabo mediante PCR con los oligonucleótidos 5'-CGAGCGTTCTGAACAAATC-3' y 5'-CCTTTCGTCTTCACCTCGA-3', que también fueron utilizados en su posterior secuenciación. En el caso del gen *bla*<sub>TEM-1</sub> portado en el plásmido pBRACI, tras la pertinente extracción y purificación del ADN plasmídico, la secuenciación se realizó con los oligonucleótidos 5'-TCTGACGCTCAGTGGAAC-3' y 5'-GGTTGCCTTACTGGTTAGC-3'.

La amplificación del gen *ftsI* se llevó a cabo con los oligonucleótidos 5'-CAGCATGTTGATCCGTCACAAG-3' y 5'-CGAGCACTGCGAGAGATGA-3'. Dado el tamaño de dicho gen (~1.8 kb), se añadió para la secuenciación el oligonucleótido intermedio 5'-CTAACAGCCCGTCATACAACC-3'. Los servicios de secuenciación fueron prestados por SECUGEN S.L. ([www.secugen.es](http://www.secugen.es)). El análisis de las secuencias se realizó con la versión libre del programa *Ridom Trace Edit* ([www.ridom.de/traceedit](http://www.ridom.de/traceedit)), y su posterior alineamiento con la secuencia del tipo salvaje se hizo con el programa *MAFFT version 6* ([mafft.cbrc.jp/alignment/software](http://mafft.cbrc.jp/alignment/software)).

## 6. 3 Resultados y discusión

Para evaluar el impacto del espectro mutacional en la elección de las trayectorias evolutivas, se procedió a la evolución experimental de dos estirpes hipermutadoras ( $\Delta mutT$  y  $\Delta mutH$ ) y la estirpe salvaje de *E. coli*, sometiénolas a incrementos periódicos de la concentración del antibiótico cefotaxima. Esta evolución se llevó a cabo para dos dosis génicas del gen codificante de la beta-lactamasa TEM-1, esto es, en un caso las 3 estirpes portando tan sólo una copia insertada en el cromosoma y en el otro portando ~20 copias de naturaleza plasmídica. El diseño experimental, por tanto, constó de 6 regímenes experimentales, combinación de 3 espectros mutacionales y 2 dosis génicas, cada uno de los cuales involucró la propagación de 96 poblaciones independientes. En la figura 6.1 se puede observar el perfil de extinción respecto a la concentración de antibiótico para cada una de estas combinaciones. En primera instancia, la figura muestra cómo tanto la hipermutación como la presencia del gen *bla<sub>TEM-1</sub>* en múltiples copias incrementa las posibilidades de supervivencia a altas dosis del antibiótico, resultados ambos razonablemente intuitivos. Una examinación algo más detallada permite observar cómo en ciertas concentraciones de antibiótico se produce la extinción simultánea de múltiples linajes independientes. Estos eventos de coextinción pueden interpretarse como indicativos de evolución en paralelo, resultado de trayectorias mutacionales que conducen a genotipos subóptimos. En este sentido, destaca la ausencia de diferencias substanciales entre las estirpes hipermutadoras; lo que en principio sería inconsistente con la hipótesis de que distintos espectros mutacionales deberían traducirse en distintas trayectorias evolutivas. La única excepción a esto es la extinción simultánea de 17 poblaciones  $\Delta mutH$  con *bla<sub>TEM-1</sub>* en copia única ocurrida a la concentración de 2ug/ml, evento ausente en el trasfondo  $\Delta mutT$ .

Con el objeto de tratar comprender los cambios a nivel molecular que subyacen a estos perfiles de extinción, procedimos a secuenciar el gen *bla<sub>TEM-1</sub>* de una colección de linajes representativos. Para cada linaje, las secuenciaciones se llevaron a cabo a partir de un aislado de la última concentración de antibiótico en la cual fue detectado crecimiento. Las secuencias mostraron que en 15 de las 24 estirpes con el gen *bla<sub>TEM-1</sub>* en plásmido no se produjo mutación alguna en dicho gen. De las 9 restantes, excepto un linaje del tipo salvaje que presentó la mutación R164H, el resto presentaron las mutaciones G238S y E104K, bien aisladas o en combinación, independientemente de su espectro mutacional. Este hecho sugiere que el incremento de las transversiones A:T→C:G, característico de las estirpes  $\Delta mutT$ , no consigue traducirse en la producción de alelos de *bla<sub>TEM-1</sub>* capaces de competir con los alelos portadores de esas mutaciones

clásicas; ya sea por su inexistencia o por el bajo nivel de resistencia que confieren. A pesar de ello, como muestra la figura 6.1, las estirpes  $\Delta mutT$  no presentaron una menor capacidad que las  $\Delta mutH$  para alcanzar altos niveles de resistencia a antibiótico. Una explicación posible a estos resultados es que la alteración de la enzima TEM-1 haya solo jugado un papel minoritario en la evolución de resistencia a cefotaxima en nuestras condiciones experimentales. En concordancia con esta interpretación, ninguno de los 34 linajes analizados con el gen  $bla_{TEM-1}$  en el cromosoma presentaron mutación alguna en dicho gen. Debe remarcarse que la cepa ancestral expresa  $bla_{TEM-1}$  de forma constitutiva, y esta es la base de su resistencia a altas concentraciones de ampicilina. La resistencia a este antibiótico permaneció prácticamente inalterada en estos linajes.

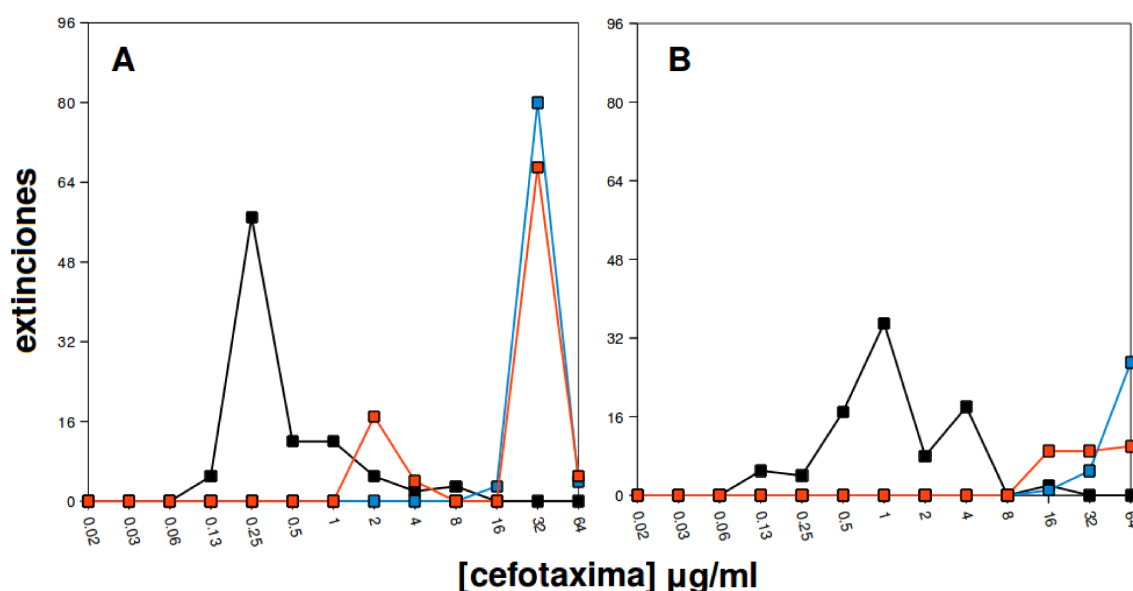


Figura 6.1.- Perfiles de extinción respecto a concentraciones crecientes de antibiótico de la estirpe salvaje (negro) y los mutantes  $\Delta mutT$  (azul) y  $\Delta mutH$  (naranja) de *E. coli*. Las poblaciones mostradas en el panel A llevan el gen  $bla_{TEM-1}$  en copia única cromosómica, mientras que las del panel B lo llevan en múltiples copias de naturaleza plasmídica.

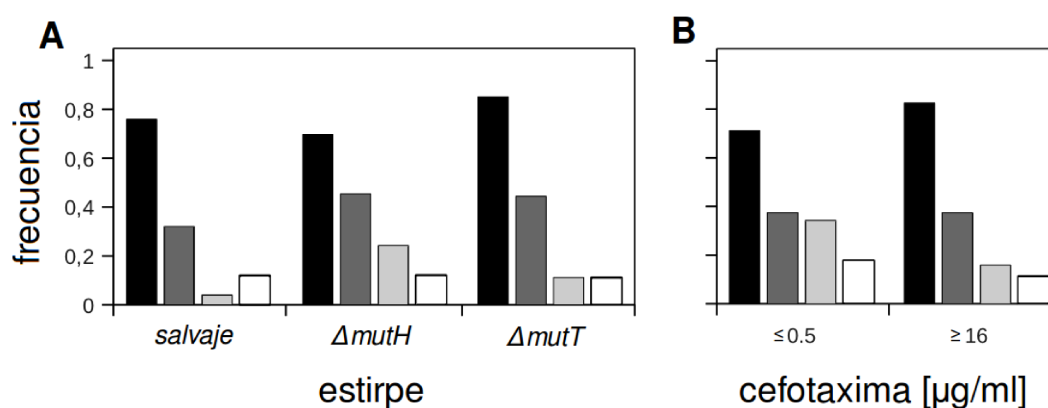
Además de mutaciones en beta-lactamasas, se sabe que la resistencia a beta-lactámicos en cepas clínicas de *E. coli* se asocia frecuentemente con alteraciones en los principales canales de entrada del antibiótico (las porinas OmpF y OmpC) y alteraciones en las bombas de expulsión de drogas (mayormente en el sistema de tres componentes AcrAB-TolC) (Nikaido y cols. 1983; Okusu y cols. 1996; Bassford y cols. 1977). Si bien está descrito que, en ausencia de beta-lactamasas, estos mecanismos tan sólo confieren resistencias de bajo o medio nivel; decidimos someter la colección de linajes a una serie de ensayos fenotípicos con el objeto de evaluar el grado de alteración

de tanto bombas como porinas. Los resultados revelaron que este tipo de alteraciones son de hecho también frecuentes en nuestros linajes, siendo la más común la afectación de las porinas (detectada en 48 de los 58 aislados). Sin embargo, como muestra la figura 6.2, no se encontraron diferencias significativas entre el tipo salvaje y las estirpes hipermutadoras ( $P > 0.2$ , test exacto de Fisher, todos los casos) lo que sugiere que este tipo de mecanismos tampoco pueden dar cuenta de los perfiles de extinción observados. Los resultados mostrados en la figura 6.2 apuntan también a esta interpretación, mostrando como estas alteraciones fenotípicas están presentes tanto en linajes extintos a bajo nivel como en linajes extintos a alto nivel. La asociación entre estos fenotipos y el nivel de resistencia se reveló no significativa ( $P > 0.36$ , test exacto de Fisher). Vale la pena reseñar cómo en torno a un 20% de los aislados presentaron hipersensibilidad a eritromicina. Atendiendo a la literatura (Vuorio y Vaara 1992) este fenotipo ha sido interpretado *a posteriori* como indicador alteraciones en las propiedades de la pared celular, aunque la exploración de esta hipótesis será motivo de trabajos futuros. En cualquier caso, este fenotipo mostró una asociación estadísticamente significativa con ambas estirpes hipermutadoras frente al tipo salvaje ( $P = 0.00045$ , test exacto de Fisher), aunque no entre ellas o entre niveles de resistencia ( $P > 0.11$ , test exacto de Fisher).

Los antibióticos beta-lactámicos ejercen su actividad uniéndose irreversiblemente al centro activo de las enzimas transpeptidasas; encargadas del último paso de la síntesis del peptidoglicano, componente esencial de la pared celular (Park y Strominger 1957). La resistencia mediada por modificaciones de estas transpeptidasas es, de hecho, un mecanismo de gran importancia clínica en bacterias Gram positivas (Georgopapadakou 1993). En Gram negativas, sin embargo, este mecanismo es menos frecuente; probablemente debido a lo efectiva que resulta en estas bacterias la combinación entre beta-lactamasas y alteraciones en expulsión y permeabilidad. En el caso concreto de *E. coli* la incidencia de este mecanismo de resistencia en aislados clínicos es prácticamente nula, aunque experimentos in vitro han demostrado que la substitución de unos pocos aminoácidos sería suficiente para conferir resistencia de alto nivel (Hedge y Spratt 1985).

Para comprobar hasta qué punto alteraciones en la transpeptidasa PBP3, diana de la cefotaxima, podrían haber jugado un papel en nuestros experimentos, procedimos a la secuenciación del gen *ftsI* en la colección de linajes evolucionados. Los resultados revelaron que 45 de los 58 aislados contienen mutaciones en este gen. Como se aprecia la figura 6.3, las substituciones más frecuentes fueron I532L y L369F, con 16 y 8 casos respectivamente; aunque el número de posiciones afectadas ascendió hasta un total 24, dando lugar a 30 alelos diferentes. Además, y a diferencia de lo observado en el caso del

gen el gen *bla<sub>TEM-1</sub>*, cada estirpe hipermutadora exhibió una fuerte tendencia a acumular sustituciones específicas de su espectro mutacional (figura 6.3). Así, las trayectorias mutacionales se mostraron substancialmente divergentes, como revela la abundancia de dobles y triples mutantes donde todas las sustituciones son específicas de cada espectro. Esta divergencia a nivel molecular contrasta con la observación de que las estirpes hipermutadoras presentan patrones de extinción similares (figura 6.1), lo que sugiere que la evolución de la resistencia a cefotaxima en la enzima PBP3 puede seguir varios caminos mutacionales funcionalmente equivalentes. De acuerdo con trabajos previos, la adaptación de esta enzima se espera que requiera una sutil remodelación del centro activo, de tal forma que sea capaz de excluir al antibiótico a la vez que retiene afinidad por el sustrato original. Es posible que esta propiedad pueda ser exhibida por múltiples configuraciones tridimensionales, cada una con una base mutacional diferente. La exploración de hipótesis deberá ser abordada en un trabajo futuro.



*Figura 6.2.- Resultados de los ensayos fenotípicos para las diferentes estirpes aquí empleadas. Las barras representan la frecuencia de aislados con alteraciones en porinas (negro), bombas (gris oscuro) y pared (gris claro). Las barras blancas representan la frecuencia de aislados sin alteraciones detectadas. El panel A compara los perfiles fenotípicos para el tipo salvaje y los mutantes  $\Delta mutT$  y  $\Delta mutH$  de E. coli. El panel B muestra la frecuencia de alteraciones entre aislados de bajo nivel y aislados de alto nivel de resistencia, independientemente de la estirpe.*

La repetibilidad de la evolución molecular se ha descrito que depende tanto del número de trayectorias mutacionales disponibles, como del efecto y la accesibilidad de sus mutaciones iniciales. Los experimentos aquí presentados trataron de comprobar hasta qué punto el espectro mutacional de cada estirpe hipermutadora, al alterar de forma diferencial la accesibilidad de las mutaciones iniciales, podría conducir a

soluciones adaptativas subóptimas. Los resultados ilustran cómo esta influencia del espectro está supeditada a las características concretas de cada carácter sometido a selección. Así, la influencia del espectro sobre la evolución del gen *bla<sub>TEM-1</sub>* ha sido prácticamente inexistente. Esto ha sido probablemente debido bien a la escasez de trayectorias mutacionales, o bien a que sus mutaciones iniciales no exhiben suficiente valor adaptativo. Por el contrario, el gen *ftsI* ha revelado una gran disponibilidad de trayectorias mutacionales, con pasos iniciales con suficiente valor adaptativo para ser seleccionados. Bajo estas circunstancias, el sesgo en la accesibilidad provocado por el espectro mutacional condujo a que las diferentes estirpes siguieran trayectorias divergentes. Sin embargo, parece que muchas de estas trayectorias permiten alcanzar niveles de adaptación equivalentes, por lo que las diferencias en el espectro no se ven reflejadas en los patrones de extinción frente a concentraciones crecientes de antibiótico.

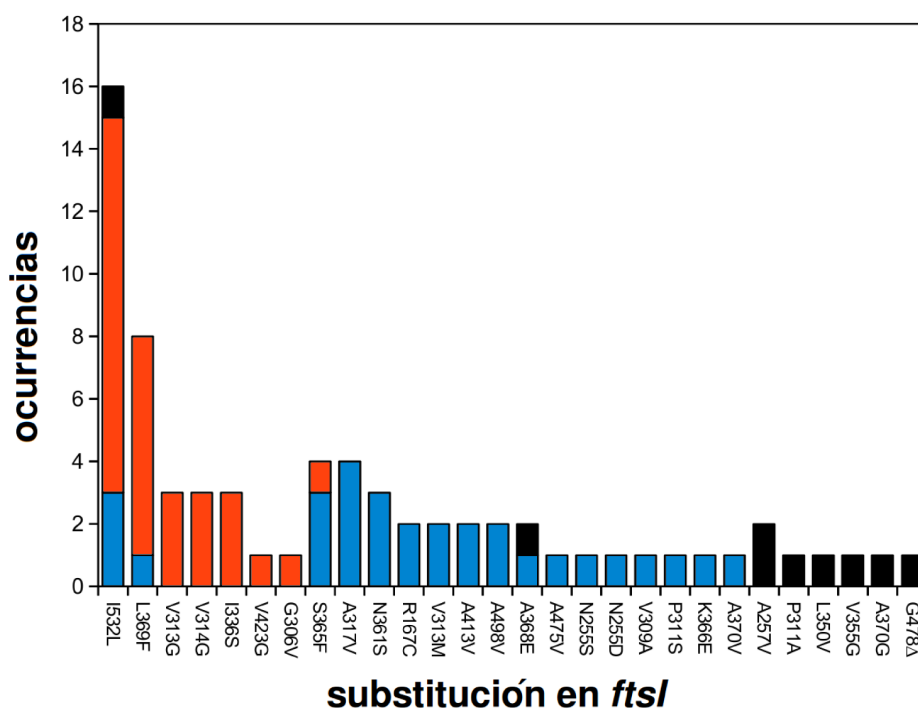


Figura 6.3.- Substituciones encontradas en el gen *ftsI*, agrupadas por frecuencia de aparición y por la correspondencia del cambio nucleotídico subyacente con el espectro mutacional del tipo salvaje (negro) y los mutantes  $\Delta\text{mutT}$  (naranja) y  $\Delta\text{mutH}$  (azul) de *E. coli*.

A nivel práctico, este trabajo resalta la importancia de conocer las bases moleculares de la resistencia para poder predecir su evolución. Dada la prevalencia de diferentes estirpes hipermutadoras entre cepas clínicas (Oliver 2010), sería de interés



determinar la capacidad de cada una para desarrollar resistencia a los antibióticos más comunes en función de su espectro mutacional. Esta información podría servir para mejorar el tratamiento de infecciones provocadas por este tipo de poblaciones, problemáticas precisamente por su conocida tendencia a adquirir múltiples resistencias con facilidad (Labat y cols. 2005).



## 7 Conclusiones

A continuación se detallan las conclusiones obtenidas tras la realización de esta tesis:

- 1.- De los estimadores más comunes de tasa de mutación empleados en experimentos con bajo número de réplicas, la media aritmética, con diferencia el más usado en la literatura, es también el mas ineficiente en términos tanto de precisión como de repetibilidad.
- 2.- En comparación con los métodos basados en promedios de la frecuencia de mutantes, los métodos de fluctuación ofrecen mayor precisión y repetibilidad en experimentos con bajo número de réplicas. De los dos métodos de fluctuación aquí evaluados, el método del valor más probable de MSS es el que ofrece el comportamiento más satisfactorio.
- 3.- La expansión clonal puede contrarrestar el incremento en diversidad genética asociado al mayor suministro mutacional de poblaciones más grandes. Para que se produzca este efecto, la condición es que la tasa de crecimiento de los mutantes sea mayor o igual que la del tipo salvaje.
- 4.- Las diferencias en el espectro mutacional pueden determinar substancialmente las habilidades competitivas de diferentes estirpes hipermutadoras.
- 5.- Pequeñas diferencias en las habilidades competitivas de las estirpes hipermutadoras, debidas a su espectro mutacional, pueden alterar la probabilidad de emergencia de estas estirpes varios órdenes de magnitud.
- 6.- Las diferencias en el espectro mutacional pueden determinar la evolución molecular de diferentes estirpes hipermutadoras. La condición para que esto suceda es que los *loci* bajo selección presenten una suficiente disponibilidad de trayectorias mutacionales, con pasos iniciales con suficiente valor adaptativo para ser seleccionados



## 8 Referencias

1. Aarseth, S. J. 1963. "Dynamical Evolution of Clusters of Galaxies, I." *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 126.
2. Adami, C. 1998. *Introduction to Artificial Life*. Springer-Verlag, New York.
3. Andersen, P., Gillow, M. and Rudjord, T. 1966. "Rhythmic Activity in a Simulated Neuronal Network." *The Journal of Physiology* 185.
4. Andersson, D. I. y Hughes, D. 2010. "Antibiotic Resistance and Its Cost: Is It Possible to Reverse Resistance?" *Nature Reviews Microbiology* 8.
5. Atwood, K. C., Schneider, L. K. y Rryan, F. J. 1951. "Selective Mechanisms in Bacteria." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 16.
6. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, M., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B. L. y Mori, H. 2006. "Construction of Escherichia coli K-12 In-frame, Single-gene Knockout Mutants: The Keio Collection." *Molecular Systems Biology* 2.
7. Barricelli, N.A. 1957. "Symbiogenetic Evolution Processes Realized by Artificial Methods." *Methodos* 9.
8. Bassford, P. J., Diedrich, D. L., Schnaitman, C. L., y Reeves, P. 1977. "Outer Membrane Proteins of Escherichia coli. VI. Protein Alteration in Bacteriophage-resistant Mutants." *Journal of Bacteriology* 131.
9. Bezuidt, O., Pierneef, R., Mncube, K., Lima-Mendez, G., y Reva, O.N. 2011. "Mainstreams of Horizontal Gene Exchange in Enterobacteria: Consideration of the Outbreak of Enterohemorrhagic E. coli O104:H4 in Germany in 2011." *PLoS ONE* 6.
10. Bjedov, I., Tenaillon, O., Gérard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F. y Matic, I. 2003. "Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria." *Science* 300.
11. Björkman, J., I. Nagaev, Berg, O. G., Hughes, D. y Andersson, D. I. 2000. "Effects of Environment on Compensatory Mutations to Ameliorate Costs of Antibiotic Resistance." *Science* 287.
12. Björkman, J., Hughes, D. y Andersson, D. I. 1998. "Virulence of Antibiotic-resistant Salmonella Typhimurium." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.
13. Black, M. L., y Gay, I. D. 1965. "Some Kinetic Properties Of A Deterministic Epidemic Confirmed By Computer Simulation." *Science* 148.
14. Blazquez, J., Morosini, M. I., Negri, M. C. y Baquero F. 2000. "Selection of Naturally Occurring Extended-spectrum TEM Beta-lactamase Variants by Fluctuating Beta-lactam Pressure." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44.

15. Boe, L., Danielsen, M., Knudsen, S., Petersen, J.B., Maymann, J. y Jensen, P. R. 2000. "The Frequency of Mutators in Populations of *Escherichia coli*." *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 448.
16. Bollback, J. P., y Huelsenbeck J.P. 2007. "Clonal Interference Is Alleviated by High Mutation Rates in Large Populations." *Molecular Biology and Evolution* 24.
17. von Borstel, R.C. 1994. "Origins of Spontaneous Base Substitutions." *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 307.
18. Buckling, A., Maclean, R.C., Brockhurst, M.A., y Colegrave N. 2009. "The Beagle in a Bottle." *Nature* 457.
19. Canham, C.D., Cole, J.J. y Lauenroth, W. K. eds. 2003. *Models in Ecosystem Science*. Princeton University Press.
20. Castañeda-García, A., Rodríguez-Rojas, A. Guelfo, J. R. y Blázquez, J. 2009. "The Glycerol-3-phosphate Permease GlpT Is the Only Fosfomycin Transporter in *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Bacteriology* 191.
21. Chao, L. 1990. "Fitness of RNA Virus Decreased by Muller's Ratchet." *Nature* 348.
22. Chou, H., Chiu, H., Delaney, N. F., Segrè, D. y Marx. C. J. 2011. "Diminishing Returns Epistasis Among Beneficial Mutations Decelerates Adaptation." *Science* 332.
23. Chow, S. S., Wilke, C. O., Ofria, C., Lenski, R. E. y Adami, C. 2004. "Adaptive Radiation from Resource Competition in Digital Organisms." *Science* 305.
24. Ciofu, O., Mandsberg, L.F., Bjarnsholt, T., Wassermann, T. y Høiby, N. 2010. "Genetic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* During Chronic Lung Infection of Patients with Cystic Fibrosis: Strong and Weak Mutators with Heterogeneous Genetic Backgrounds Emerge in *mucA* and/or *lasR* Mutants." *Microbiology* 156.
25. Clark, D. P. y Pazdernik, N. J. 2012. *Molecular Biology, 2nd Edition*. Academic Cell.
26. Cleland, C. E. 2001. "Historical Science, Experimental Science, and the Scientific Method." *Geology* 29.
27. Coe, R. M. 1964. "Conflict, Interference, and Aggression: Computer Simulation of a Social Process." *Behavioral Science* 9.
28. Cooper, T. F. 2007. "Recombination Speeds Adaptation by Reducing Competition Between Beneficial Mutations in Populations of *Escherichia coli*." *PLoS Biol* 5.
29. Cooper, T. F., Remold, S. K., Lenski, R. E., y Schneider, D. 2008. "Expression Profiles Reveal Parallel Evolution of Epistatic Interactions Involving the CRP Regulon in *Escherichia coli*." *PLoS Genet* 4.
30. Cooper, V. S. y Lenski, R. E. 2000. "The Population Genetics of Ecological Specialization in Evolving *Escherichia coli* Populations." *Nature* 407.
31. Couce, A., Briales, A. Rodríguez-Rojas, A. Costas, C., Pascual, A. y Blázquez, J.. 2012. "Genomewide Overexpression Screen for Fosfomycin Resistance in *Escherichia coli*:

- MurA Confers Clinical Resistance at Low Fitness Cost.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56.
32. Cozzarelli, N. 1980. “DNA Gyrase and the Supercoiling of DNA.” *Science* 207.
  33. Dallinger, W. H. 1878. “On the Life-History of a Minute Septic Organism: With an Account of Experiments Made to Determine Its Thermal Death Point.” *Proceedings of the Royal Society of London* 27.
  34. Datsenko, K. A. y Wanner B. L. 2000. “One-step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97.
  35. Datta, N. y Kontomichalou, P. 1965. “Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae.” *Nature* 208.
  36. Denamur, E. y Matic, I. 2006. “Evolution of Mutation Rates in Bacteria.” *Molecular Microbiology* 60.
  37. Desai, M. M., Fisher, D. S. y Murray, A. W. 2007. “The Speed of Evolution and Maintenance of Variation in Asexual Populations.” *Current Biology* 17.
  38. Dettman, J. R., Rodrigue, N., Melnyk, A. H., Wong, A., Bailey, S. F. y Kassen, R. 2012. “Evolutionary Insight from Whole-genome Sequencing of Experimentally Evolved Microbes.” *Molecular Ecology* 21.
  39. Drake, J W. 1991. “A Constant Rate of Spontaneous Mutation in DNA-based Microbes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88.
  40. Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D. y Crow, J. F. 1998. “Rates of Spontaneous Mutation.” *Genetics* 148.
  41. Dutra, B. E. y Lovett, S. T. 2006. “Cis and Trans-acting Effects on a Mutational Hotspot Involving a Replication Template Switch.” *Journal of Molecular Biology* 356.
  42. Dykhuizen, D. E. y Hartl, D. L. 1983. “Selection in Chemostats.” *Microbiological Reviews* 47.
  43. ECDC/EMEA Joint Technical Report. 2009. “The Bacterial Challenge: Time to React.” [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC\\_DispForm.aspx?ID=444](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=444).
  44. Elena, S. F. y Lenski, R. E. 2003. “Evolution Experiments with Microorganisms: The Dynamics and Genetic Bases of Adaptation.” *Nature Reviews Genetics* 4.
  45. Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. y Stackebrandt, E.. 2006. *The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer.
  46. Fischer, E. P. 2007. “Max Delbrück.” *Genetics* 177.
  47. Fisher, R. A. 1930. *The Genetical Theory Of Natural Selection*. The Clarendon Press, Oxford.
  48. Foster, P. L. 2006. “Methods for Determining Spontaneous Mutation Rates.” *Methods in*

*Enzymology* 409.

49. Frank, L. H. y DeMoss, R. D. 1959. "On the Biosynthesis of Pyocyanine." *Journal of Bacteriology* 77.
50. Frère, J. M. 1995. "Beta-lactamases and Bacterial Resistance to Antibiotics." *Molecular Microbiology* 16.
51. Friedberg, E. C. 2003. "DNA Damage and Repair." *Nature* 421.
52. Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A. y Ellenberger, T. 2006. *DNA Repair and Mutagenesis*. 2nd ed. ASM Press.
53. Futuyma, D. J. 2009. *Evolution*. Sinauer Associates.
54. Garfinkel, D. 1962. "Digital Computer Simulation of Ecological Systems." *Nature* 194.
55. Garibyan, L., Huang, T., Kim, M., Wolff, E., Nguyen, A., Nguyen, T., Diep, A. y cols. 2003. "Use of the rpoB Gene to Determine the Specificity of Base Substitution Mutations on the Escherichia coli Chromosome." *DNA Repair* 2.
56. Gayon, J. 1998. *Darwinism's Struggle for Survival: Heredity and the Hypothesis of Natural Selection*. Cambridge University Press.
57. Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., Itoh, T. y Tomizawa, J. 1977. "Nalidixic Acid Resistance: A Second Genetic Character Involved in DNA Gyrase Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74.
58. Gellert, M., O'Dea, M. H., Itoh, T. y Tomizawa, J. 1976. "Novobiocin and Coumermycin Inhibit DNA Supercoiling Catalyzed by DNA Gyrase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73.
59. Georgopapadakou, N. H. 1993. "Penicillin-binding Proteins and Bacterial Resistance to Beta-lactams." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37.
60. Gerrish, P. 2008. "A Simple Formula for Obtaining Markedly Improved Mutation Rate Estimates." *Genetics* 180.
61. Gerritsma, R., Kirchmair, G., Zähringer, F., Solano, E., Blatt, R. y Roos, C. F. 2010. "Quantum Simulation of the Dirac Equation." *Nature* 463.
62. Gillett, N. P., y Thompson, D. W. J. 2003. "Simulation of Recent Southern Hemisphere Climate Change." *Science* 302.
63. Goddard, M. R., Godfray, H. C. J. y Burt, A. 2005. "Sex Increases the Efficacy of Natural Selection in Experimental Yeast Populations." *Nature* 434.
64. Goldsmith, M. y Tawfik, D. S. 2009. "Potential Role of Phenotypic Mutations in the Evolution of Protein Expression and Stability." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.
65. Gould, H., Tobochnik, J. y Christian, W. 2006. *An Introduction to Computer Simulation Methods: Applications to Physical Systems*. 3rd. Addison-Wesley.
66. Gould, S. J. 1991. *Wonderful Life: Burgess Shale and the Nature of History*. Penguin



Books Ltd.

67. Gudelj, I., Weitz, J. S., Ferenci, T., Horner-Devine, M. C., Marx, C. J., Meyer, J. R. y Forde, S. E. 2010. "An Integrative Approach to Understanding Microbial Diversity: From Intracellular Mechanisms to Community Structure." *Ecology Letters* 13.
68. Gupta, P. 2005. *The Six Sigma Performance Handbook: a Statistical Guide to Optimizing Results*. McGraw-Hill Professional.
69. Guyer, B., Freedman, M. A, Strobino, D. M y Sondik, E. J. 2000. "Annual Summary of Vital Statistics: Trends in the Health of Americans During the 20th Century." *Pediatrics* 106.
70. Hall, A. y Knowles, J. R. 1976. "Directed Selective Pressure on a B-lactamase to Analyse Molecular Changes Involved in Development of Enzyme Function." *Nature* 264.
71. Hall, A. R., Griffiths, V. F., MacLean, R. C. y Colegrave, N. 2010. "Mutational Neighbourhood and Mutation Supply Rate Constrain Adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proceedings of The Royal Society B* 277.
72. Hall, A. R., Iles, J. C. y MacLean, R. C. 2011. "The Fitness Cost of Rifampicin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Depends on Demand for RNA Polymerase." *Genetics* 187.
73. Hall, B. G. 2002. "Predicting Evolution by In Vitro Evolution Requires Determining Evolutionary Pathways." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46.
74. Hall, B. M., Ma, C., Liang, P. y Singh, K. K. 2009. "Fluctuation Analysis CalculatOR: a Web Tool for the Determination of Mutation Rate Using Luria-Delbruck Fluctuation Analysis." *Bioinformatics* 25.
75. Hall, L. M. C., y Henderson-Begg, S. K. 2006. "Hypermutable Bacteria Isolated from Humans--a Critical Analysis." *Microbiology* 152.
76. Handel, A. y Rozen, D. 2009. "The Impact of Population Size on the Evolution of Asexual Microbes on Smooth Versus Rugged Fitness Landscapes." *BMC Evolutionary Biology* 9.
77. Hartmann, G., Honikel, K. O., Knüsel, F. y Nüesch, J. 1967. "The Specific Inhibition of the DNA-directed RNA Synthesis by Rifamycin." *Biochimica Et Biophysica Acta* 145.
78. Hedge, P. J. y Spratt, B. G. 1985. "Resistance to Beta-lactam Antibiotics by Remodelling the Active Site of an *E. coli* Penicillin-binding Protein." *Nature* 318.
79. Hegreness, M., Shores, N., Hartl, D. y Kishony, R. 2006. "An Equivalence Principle for the Incorporation of Favorable Mutations in Asexual Populations." *Science* 311.
80. Helling, R. B., Vargas, C. N. y Adams, J. 1987. "Evolution of *Escherichia coli* During Growth in a Constant Environment." *Genetics* 116.
81. Hill, W. G. y Robertson, A. 1966. "The Effect of Linkage on Limits to Artificial

- Selection.” *Genetics Research* 8.
82. Huxley, J. 1975. *Evolution: The Modern Synthesis*. 3rd. Macmillan Pub Co.
  83. Jones, M. E., Thomas, S. M. y Rogers, A. 1994. “Luria-Delbrück Fluctuation Experiments: Design and Analysis.” *Genetics* 136.
  84. Kahlmeter, G., Munday, P. y Cars, O. 2003. “Non-hospital Antimicrobial Usage and Resistance in Community-acquired Escherichia coli Urinary Tract Infection.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52.
  85. Kaper, J. B., Nataro, J. P. y Mobley, H. L. T. 2004. “Pathogenic Escherichia coli.” *Nature Reviews Microbiology* 2.
  86. Kassen, R. y Rainey, P. B. 2004. “The Ecology and Genetics of Microbial Diversity.” *Annual Review of Microbiology* 58.
  87. Kauffman, S. A. 1969. “Metabolic Stability and Epigenesis in Randomly Constructed Genetic Nets.” *Journal of Theoretical Biology* 22.
  88. Kenna, D. T., Doherty, C. J., Foweraker, J., Macaskill, L., Barcus, V. A. y Govan, J. R. W. 2007. “Hypermotability in Environmental Pseudomonas aeruginosa and in Populations Causing Pulmonary Infection in Individuals with Cystic Fibrosis.” *Microbiology* 153.
  89. Khan, A. I., Dinh, D. M., Schneider, D., Lenski, R. E. y Cooper, T. F. 2011. “Negative Epistasis Between Beneficial Mutations in an Evolving Bacterial Population.” *Science* 332.
  90. Kimura, M. 1967. “On the Evolutionary Adjustment of Spontaneous Mutation Rates.” *Genetics Research* 9.
  91. Kimura, M., y Maruyama, T. 1966. “The Mutational Load with Epistatic Gene Interactions in Fitness.” *Genetics* 54.
  92. Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C. F., Stanke, F., Larbig, K. D., Heeb, S. y cols. 2010. “Genome Diversity of Pseudomonas aeruginosa PAO1 Laboratory Strains.” *Journal of Bacteriology* 192.
  93. Koch, A. L. 1982. “Mutation and Growth Rates from Luria-Delbrück Fluctuation Tests.” *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 95.
  94. Labat, F., Pradillon, O., Garry, L., Peuchmaur, M., Fantin, B. y Denamur, E. 2005. “Mutator Phenotype Confers Advantage in Escherichia coli Chronic Urinary Tract Infection Pathogenesis.” *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 44.
  95. Lang, G. I., Botstein, D. y Desai, M. M. 2011. “Genetic Variation and the Fate of Beneficial Mutations in Asexual Populations.” *Genetics* 188.
  96. Lang, G. I y Murray, A. W. 2008. “Estimating the per-base-pair Mutation Rate in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae.” *Genetics* 178.
  97. Lea, D. E. y Coulson, C. A. 1949. “The Distribution of the Numbers of Mutants in

- Bacterial Populations.” *Journal of Genetics* 49.
98. Lederberg, J. y Lederberg, E. M. 1952. “Replica Plating And Indirect Selection Of Bacterial Mutants.” *Journal of Bacteriology* 63 (3) (March): 399–406.
  99. Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T. y cols. 2006. “Genomic Analysis Reveals that *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Is Combinatorial.” *Genome Biology* 7.
  100. Leigh, E. G. 1970. “Natural Selection and Mutability.” *The American Naturalist* 104.
  101. Lenhard, J., Küppers, G. y Shinn, T. eds. 2007. *Simulation: Pragmatic Constructions of Reality 1st*. Springer.
  102. Lennox, E. S. 1955. “Transduction of Linked Genetic Characters of the Host by Bacteriophage P1.” *Virology* 1.
  103. Lenski, R. E. 1988. “Experimental Studies of Pleiotropy and Epistasis in *Escherichia coli*. II. Compensation for Maldaptive Effects Associated with Resistance to Virus T4.” *Evolution* 42.
  104. Lenski, R. E., Ofria, E., Collier, T. C. y Adami, C. 1999. “Genome Complexity, Robustness and Genetic Interactions in Digital Organisms.” *Nature* 400.
  105. Lenski, R. E., Ofria, C., Pennock, R. T. y Adami, C. 2003. “The Evolutionary Origin of Complex Features.” *Nature* 423.
  106. Lenski, R. E., Rose, M. R., Simpson, S. C. y Tadler, S. C. 1991. “Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations.” *The American Naturalist* 138.
  107. Lindahl, T. 1993. “Instability and Decay of the Primary Structure of DNA.” *Nature* 362.
  108. Livermore, D. M. 2002. “Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?” *Clinical Infectious Diseases* 34.
  109. Lockwood, A. H., Chakraborty, P. R. y Maitra, U.. 1971. “A Complex Between Initiation Factor IF2, Guanosine Triphosphate, and fMet-tRNA: An Intermediate in Initiation Complex Formation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68.
  110. Lovett, S. T. 2004. “Encoded Errors: Mutations and Rearrangements Mediated by Misalignment at Repetitive DNA Sequences.” *Molecular Microbiology* 52.
  111. Luria, S. E. 1984. *A Slot Machine, a Broken Test Tube: An Autobiography*. Harper & Row.
  112. Luria, S. E. y Delbrück M. 1943. “Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance.” *Genetics* 28.
  113. Luzzatto, L., Apirion, D. y Schlessinger, D. 1968. “Mechanism of Action of Streptomycin in *E. coli*: Interruption of the Ribosome Cycle at the Initiation of Protein Synthesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America 60.

114. Mackay, T. F. 1996. "The Nature of Quantitative Genetic Variation Revisited: Lessons from *Drosophila* Bristles." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 18.
115. MacLean, R. C. 2005. "Adaptive Radiation in Microbial Microcosms." *Journal of Evolutionary Biology* 18.
116. MacLean, R. C., y Buckling, A. 2009. "The Distribution of Fitness Effects of Beneficial Mutations in *Pseudomonas aeruginosa*." *PLoS Genetics* 5.
117. MacLean, R. C., Hall, A. R., Perron, G. G. and Buckling, A. 2010. "The Population Genetics of Antibiotic Resistance: Integrating Molecular Mechanisms y Treatment Contexts." *Nature Reviews Genetics* 11.
118. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Brock, T. D. y Parker, J. 2003. *Brock biología de los microorganismos*. Pearson.
119. Maharjan, R., Seeto, S., Notley-McRobb, L. y Ferenci, T. 2006. "Clonal Adaptive Radiation in a Constant Environment." *Science* 313.
120. Maher, D., y Nunn, P. 1998. "Commentary: Making Tuberculosis Treatment Available for All." *Bulletin of the World Health Organization* 76.
121. Maki, H. 2002. "Origins of Spontaneous Mutations: Specificity and Directionality of Base-substitution, Frameshift, and Sequence-substitution Mutageneses." *Annual Review of Genetics* 36.
122. Manning, S. D., y Babcock, H. 2010. *Escherichia coli* Infections. Facts On File.
123. Martínez-Antonio, A. y Collado-Vides, J. 2003. "Identifying Global Regulators in Transcriptional Regulatory Networks in Bacteria." *Current Opinion in Microbiology* 6.
124. McDonald, M. J., Gehrig, S. M., Meintjes, P. L., Zhang, X. y Rainey, P. B. 2009. "Adaptive Divergence in Experimental Populations of *Pseudomonas Fluorescens*. IV. Genetic Constraints Guide Evolutionary Trajectories in a Parallel Adaptive Radiation." *Genetics* 183.
125. Mena, A., Smith, E. E., Burns, J. L., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Perez, J. L. y Oliver, A. 2008. "Genetic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the Airways of Cystic Fibrosis Patients Is Catalyzed by Hypermutation." *Journal of Bacteriology* 190.
126. Michaels, M. L. y J. H. Miller. 1992. "The GO System Protects Organisms from the Mutagenic Effect of the Spontaneous Lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine)." *Journal of Bacteriology* 174.
127. Miller, J. H. 1996. "Spontaneous Mutators In Bacteria: Insights into Pathways of Mutagenesis and Repair." *Annual Review of Microbiology* 50.

128. Miralles, R., Gerrish, P. J., Moya, A. y Elena, S. F. 1999. "Clonal Interference and the Evolution of RNA Viruses." *Science* 285.
129. Monro, R. E. 1967. "Catalysis of Peptide Bond Formation by 50s Ribosomal Subunits from *Escherichia coli*." *Journal of Molecular Biology* 26.
130. Montanari, S., Oliver, A., Salerno, P., Mena, A., Bertoni, G., Tümmler, B., Cariani, L., Conese, M., Döring, G y Bragonzi, A. 2007. "Biological Cost of Hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Patients with Cystic Fibrosis." *Microbiology* 153.
131. Morse, M. L., Lederberg, E. M. y Lederberg, J. 1956. "Transduction in *Escherichia coli* K-12." *Genetics* 41.
132. Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H. E. 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and molecular biology. Volumes I and II*. American Society for Microbiology.
133. Nikaido, H., Rosenberg, E. Y. y Foulds, J. 1983. "Porin Channels in *Escherichia coli*: Studies with Beta-lactams in Intact Cells." *Journal of Bacteriology* 153.
134. Notley-McRobb, L., King, T. y Ferenci, T. 2002. "rpoS Mutations and Loss of General Stress Resistance in *Escherichia coli* Populations as a Consequence of Conflict Between Competing Stress Responses." *Journal of Bacteriology* 184.
135. Notley-McRobb, L., Seeto, S. y Ferenci, T. 2002. "Enrichment and Elimination of mutY Mutators in *Escherichia coli* Populations." *Genetics* 162.
136. Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Tarry, M. J., Carter, A. P. y Ramakrishnan, V. 2001. "Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30s Ribosomal Subunit." *Science* 292.
137. Ogle, J. M. y Ramakrishnan, V. 2005. "Structural Insights into Translational Fidelity." *Annual Review of Biochemistry* 74.
138. Okusu, H., Ma, D. y Nikaido, H. 1996. "AcrAB Efflux Pump Plays a Major Role in the Antibiotic Resistance Phenotype of *Escherichia coli* Multiple-antibiotic-resistance (Mar) Mutants." *Journal of Bacteriology* 178.
139. Oliver, A. y Mena, A. 2010. "Bacterial Hypermutation in Cystic Fibrosis, Not Only for Antibiotic Resistance." *Clinical Microbiology and Infection* 16.
140. Oliver, A.. 2010. "Mutators in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infection: Prevalence, Mechanisms, and Consequences for Antimicrobial Therapy." *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 300 (8) (December): 563–572. doi:10.1016/j.ijmm.2010.08.009.
141. Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F. y Blázquez, J. 2000. "High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection." *Science* 288.

142. Pal, C., Macia, M. D., Oliver, A., Schachar, I. y Buckling, A. 2007. "Coevolution with Viruses Drives the Evolution of Bacterial Mutation Rates." *Nature* 450.
143. Park, J. T. y Strominger, J. L. 1957. "Mode of Action of Penicillin: Biochemical Basis for the Mechanism of Action of Penicillin and for Its Selective Toxicity." *Science* 125.
144. Peck, S. L. 2004. "Simulation as Experiment: a Philosophical Reassessment for Biological Modeling." *Trends in Ecology & Evolution* 19.
145. Pfeiffer, T. y Bonhoeffer, S. 2004. "Evolution of Cross-feeding in Microbial Populations." *The American Naturalist* 163.
146. Philippe, N., Crozat, E., Lenski, R. E., y Schneider, D. 2007. "Evolution of Global Regulatory Networks During a Long-term Experiment with *Escherichia coli*." *BioEssays* 29.
147. Pielou, E. C. 1966. "The Measurement of Diversity in Different Types of Biological Collections." *Journal of Theoretical Biology* 13.
148. Pope, C. F., O'Sullivan, D. M., McHugh, T. D. y Gillespie, S. H.. 2008. "A Practical Guide to Measuring Mutation Rates in Antibiotic Resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52.
149. Poulsen, S. M., Karlsson, M., Johansson, L. B. y Vester, B. 2001. "The Pleuromutilin Drugs Tiamulin and Valnemulin Bind to the RNA at the Peptidyl Transferase Centre on the Ribosome." *Molecular Microbiology* 41.
150. Prindle, M. J., Fox, E. J. y Loeb, L. A. 2010. "The Mutator Phenotype in Cancer: Molecular Mechanisms and Targeting Strategies." *Current Drug Targets* 11.
151. Punnett, R. C. 1915. *Mendelism 3rd*. Macmillan.
152. Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. y Ausubel, F. M. 1995. "Common Virulence Factors for Bacterial Pathogenicity in Plants and Animals." *Science* 268.
153. Rainey, P. B. y Travisano, M. 1998. "Adaptive Radiation in a Heterogeneous Environment." *Nature* 394.
154. Ramos, J. y Filloux, A. eds. 2007. *Pseudomonas: Volume 5: A Model System in Biology*. Springer.
155. Ran, H., Hassett, D. J. y Lau, G. W. 2003. "Human Targets of *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.
156. Ray, T. S. 1991. "An Approach to the Synthesis of Life." in Langton, C. G., Taylor, C., Farmer, D. y Rasmussen, S. eds. *Artificial Life II*. Addison-Wesley.
157. Reynolds, M. G. 2000. "Compensatory Evolution in Rifampin-Resistant *Escherichia coli*." *Genetics* 156.
158. Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K. B., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R.,

- Glasner, J. D. y cols. 2006. "Escherichia coli K-12: a Cooperatively Developed Annotation Snapshot—2005." *Nucleic Acids Research* 34.
159. Rodríguez-Rojas, A., Couce, A. y Blázquez, J. 2010. "Frequency of Spontaneous Resistance to Fosfomicin Combined with Different Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54.
  160. Rosche, W. A. y Foster, P. L. 2000. "Determining Mutation Rates in Bacterial Populations." *Methods* 20.
  161. Rosenzweig, R. F., Sharp, R. R., Treves, D. S. y Adams, J. 1994. "Microbial Evolution in a Simple Unstructured Environment: Genetic Differentiation in *Escherichia coli*." *Genetics* 137.
  162. Rozen, D. E., Habets, M. G. J. L., Handel, A. y de Visser, J. A. G. M. 2008. "Heterogeneous Adaptive Trajectories of Small Populations on Complex Fitness Landscapes." *PLoS ONE* 3.
  163. Rozen, D. E., de Visser, J. A. G. M., y Gerrish, P. J. 2002. "Fitness Effects of Fixed Beneficial Mutations in Microbial Populations." *Current Biology* 12.
  164. Rozen, D. E. y Lenski, R. E.. 2000. "Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. VIII. Dynamics of a Balanced Polymorphism." *The American Naturalist* 155.
  165. Salverda, M. L. M., Dellus, E., Gorter, F. A., Debets, A. J. M., van der Oost, J., Hoekstra, R. F., Tawfik, D. S. y de Visser, J. A. G. M. 2011. "Initial Mutations Direct Alternative Pathways of Protein Evolution." *PLoS Genet* 7.
  166. Salverda, M. L. M., de Visser, J. A. G. M. y Barlow, M. 2010. "Natural Evolution of TEM-1 B-lactamase: Experimental Reconstruction and Clinical Relevance." *FEMS Microbiology Reviews* 34.
  167. Sanders, L. H., Sudhakaran, J. y Sutton, M. D. 2009. "The GO System Prevents ROS-induced Mutagenesis and Killing in *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiology Letters* 294.
  168. Sarkar, S., Ma, W. T. y Sandri, G. H. 1992. "On Fluctuation Analysis: a New, Simple and Efficient Method for Computing the Expected Number of Mutants." *Genetica* 85.
  169. Schaaper, R. M., Danforth, B. N. y Glickman, B. W. 1986. "Mechanisms of Spontaneous Mutagenesis: An Analysis of the Spectrum of Spontaneous Mutation in the *Escherichia coli* lacI Gene." *Journal of Molecular Biology* 189.
  170. Schaechter, M. 2001. "Escherichia coli and Salmonella 2000: The View From Here." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65.
  171. Schenk, M. F., Szendro, I. G., Krug, J. y de Visser, J. A. G. M. 2012. "Quantifying the Adaptive Potential of an Antibiotic Resistance Enzyme." *PLoS Genetics* 8.
  172. Schrag, S. J., y Perrot, V. 1996. "Reducing Antibiotic Resistance." *Nature* 381.
  173. Shaver, A. C., Dombrowski, P. G., Sweeney, J. Y., Treis, T., Zappala, R. M. y Sniegowski,

- P. D. 2002. "Fitness Evolution and the Rise of Mutator Alleles in Experimental *Escherichia coli* Populations." *Genetics* 162.
174. Silverman, E., y Bryden J. 2007. "From Artificial Societies to New Social Science Theory." in *Proceedings of the 9th European Conference on Advances in Artificial Life*, ECAL'07. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
  175. Simpson E. H. 1949 "Measurement of Diversity." *Nature* 163.
  176. Sloane, D. L., Goodman, M. F. y Echols, H. 1988. "The Fidelity of Base Selection by the Polymerase Subunit of DNA Polymerase III Holoenzyme." *Nucleic Acids Research* 16.
  177. Sniegowski, P. D., y Gerrish, P. J. 2010. "Beneficial Mutations and the Dynamics of Adaptation in Asexual Populations." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365.
  178. Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J. y Lenski, R. E. 1997. "Evolution of High Mutation Rates in Experimental Populations of *E. coli*." *Nature* 387.
  179. Spratt, B. G. 1975. "Distinct Penicillin Binding Proteins Involved in the Division, Elongation, and Shape of *Escherichia coli* K12." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72.
  180. Stewart, F. M. 1994. "Fluctuation Tests: How Reliable are the Estimates of Mutation Rates?" *Genetics* 137.
  181. Stoltzfus, A. 2006. "Mutationism and the Dual Causation of Evolutionary Change." *Evolution & Development* 8.
  182. Sturtevant, A. H. 1937. "Essays on Evolution. I. On the Effects of Selection on Mutation Rate." *The Quarterly Review of Biology* 12.
  183. Taddei, F., Radman, M., Maynard-Smith, J., Toupance, B., Gouyon, P. H. y Godelle, B. 1997. "Role of Mutator Alleles in Adaptive Evolution." *Nature* 387.
  184. Tanaka, M. M., Bergstrom, C. T. y Levin, B. R. 2003. "The Evolution of Mutator Genes in Bacterial Populations: The Roles of Environmental Change and Timing." *Genetics* 164.
  185. Tenaillon, O., Rodríguez-Verdugo, A., Gaut, R. L., McDonald, P., Bennett, A. F., Long, A. D. y Gaut, B. S. 2012. "The Molecular Diversity of Adaptive Convergence." *Science* 335.
  186. Tenaillon, O., Toupance, B., le Nagard, H., Taddei, F. y Godelle, B. 1999. "Mutators, Population Size, Adaptive Landscape and the Adaptation of Asexual Populations of Bacteria." *Genetics* 152.
  187. Timms, A. R., Steingrimsdottir, H., Lehmann, A. R. y Bridges, B. A. 1992. "Mutant Sequences in the *rpsL* Gene of *Escherichia coli* B/r: Mechanistic Implications for Spontaneous and Ultraviolet Light Mutagenesis." *Molecular & General Genetics*:



188. Travisano, M., Mongold, J. A., Bennett, A. F. y Lenski, R. E.. 1995. "Experimental Tests of the Roles of Adaptation, Chance, and History in Evolution." *Science* 267.
189. Trindade, S., Perfeito, L. y Gordo, I. 2010. "Rate and Effects of Spontaneous Mutations That Affect Fitness in Mutator *Escherichia coli*." *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365.
190. Trindade, S., Sousa, A., Xavier, K. B., Dionisio, F., Ferreira, M. G. y Gordo, I. 2009. "Positive Epistasis Drives the Acquisition of Multidrug Resistance." *PLoS Genetics* 5.
191. Turner, P. E., Souza, V. y Lenski, R. E.. 1996. "Tests of Ecological Mechanisms Promoting the Stable Coexistence of Two Bacterial Genotypes." *Ecology* 77.
192. Villavicencio, R. T. 1998. "The History of Blue Pus." *Journal of the American College of Surgeons* 187.
193. de Visser, J. A. G. M., Zeyl, C.W., Gerrish, P. J., Blanchard, J. L. y Lenski, R. E., 1999. "Diminishing Returns from Mutation Supply Rate in Asexual Populations." *Science* 283.
194. Vuorio, R. y Vaara, M. 1992. "The Lipid A Biosynthesis Mutation *lpxA2* of *Escherichia coli* Results in Drastic Antibiotic Supersusceptibility." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36.
195. Ward, H., Perron, G. G. y Maclean, R. C. 2009. "The Cost of Multiple Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Evolutionary Biology* 22.
196. Weinreich, D. M., Delaney, N. F., DePristo, M. A. y Hartl, D. L. 2006. "Darwinian Evolution Can Follow Only Very Few Mutational Paths to Fitter Proteins." *Science* 312.
197. Weir, B. S., Anderson, A. D. y Hepler, A. B. 2006. "Genetic Relatedness Analysis: Modern Data and New Challenges." *Nature Reviews. Genetics* 7.
198. Weissmann, G. 2010. "Filter the Dogs: Microbial Mishaps in Massachusetts." *The FASEB Journal* 24.
199. Wichman, H. A., Badgett, M. R., Scott, L. A., Boulianne, C. M. y Bull, J. J. 1999. "Different Trajectories of Parallel Evolution During Viral Adaptation." *Science* 285.
200. Wilke, C. O. y Adami, C. 2002. "The Biology of Digital Organisms." *Trends in Ecology & Evolution* 17.
201. Wilke, C. O., Wang, J. L., Ofria, C., Lenski, R. E., y Adami, C. 2001. "Evolution of Digital Organisms at High Mutation Rates Leads to Survival of the Flattest." *Nature* 412.
202. Winsberg, E. 2010. *Science in the Age of Computer Simulation*. University Of Chicago Press.

203. Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos, P., Verstraete, W. y Boon, N. 2009. "Initial Community Evenness Favours Functionality Under Selective Stress." *Nature* 458.
204. Wylie, C. S., Ghim, C., Kessler, D. y Levine, H. 2009. "The Fixation Probability of Rare Mutators in Finite Asexual Populations." *Genetics* 181.
205. Yoshikawa, T. T. 2002. "Antimicrobial Resistance and Aging: Beginning of the End of the Antibiotic Era?" *Journal of the American Geriatrics Society* 50.
206. Zeyl, C., y Bell, G. 1997. "The Advantage of Sex in Evolving Yeast Populations." *Nature* 388.
207. Zhang, E, y Ferenci, T. 1999. "OmpF Changes and the Complexity of Escherichia coli Adaptation to Prolonged Lactose Limitation." *FEMS Microbiology Letters* 176.
208. Zheng, Q. 2002. "Statistical and Algorithmic Methods for Fluctuation Analysis with SALVADOR as an Implementation." *Mathematical Biosciences* 176.

## 9 Anexo

### 9.1 Artículos culminados durante la realización de esta tesis

1. Couce, A., Guelfo, J. R. y Blázquez, J. (en prensa). "Mutational Spectrum Drives the Rise of Mutator Bacteria." *PloS Genetics*.
2. Blázquez, J. y Couce, A., Rodríguez-Beltrán J. y Rodríguez-Rojas A. 2012. "Antimicrobials as Promoters of Genetic Variation." *Current Opinion in Microbiology* 15
3. Rodríguez-Beltrán, J., Rodríguez-Rojas, A., Guelfo, J.R., Couce, A. y Blázquez, J. 2012. "The Escherichia Coli Sos Gene DinF Protects against Oxidative Stress and Bile Salts." *PLoS One* 7
4. Couce, A., Briales, A., Rodríguez-Rojas, A., Costas, C., Pascual, A. y Blázquez, J. 2012. "Genomewide Overexpression Screen for Fosfomycin Resistance in Escherichia Coli: MurA Confers Clinical Resistance at Low Fitness Cost." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56
5. Couce, A. y Blázquez, J. 2011. "Estimating Mutation Rates in Low-Replication Experiments." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 714.
6. Thi, T. D., López, E., Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Guelfo, J. R., Castañeda-García, A. y Blázquez, J. 2011. "Effect of RecA Inactivation on Mutagenesis of Escherichia Coli Exposed to Sublethal Concentrations of Antimicrobials." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66.
7. Rodríguez-Rojas, A., Couce, A. y Blázquez J. 2010. "Frequency of Spontaneous Resistance to Fosfomycin Combined with Different Antibiotics in Pseudomonas Aeruginosa." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54.
8. Rodríguez-Rojas, A., Maciá, M. D., Couce, A., Gómez, C., Castañeda-García, A., Oliver, A. y Blázquez, J. 2010. "Assessing the Emergence of Resistance: The Absence of Biological Cost In Vivo May Compromise Fosfomycin Treatments for P. Aeruginosa Infections." *PLoS One* 5.
9. Couce, A. y Blázquez, J. 2009. "Side Effects Of Antibiotics On Genetic Variability." *FEMS Microbiology Reviews* 33.